

## 資料2

# 遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の 承認申請に係る審査報告書

高染色性絹糸生産カイコ( *改変 Fibroin H,*  
*Bombyx mori* ), (中 515 号 × GCS500)

平成 28 年 3 月 24 日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課

# 目 次

	頁
1 . 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論 . . . . .	1
2 . 審査の概要 . . . . .	2
審査参考資料	
資料 1 . 第一種使用規程承認申請書 . . . . .	9
資料 2 . モニタリング計画書 . . . . .	23
資料 3 . 緊急措置計画書 . . . . .	27
資料 4 . 審査データの概要 . . . . .	33

Most of the summaries and evaluations contained in this report are based on unpublished proprietary data submitted for registration to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan. A registration authority outside of Japan should not grant a registration on the basis of an evaluation unless it has first received authorization for such use from the owner of the data submitted to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan or has received the data on which the summaries are based, either from the owner of the data or from a second party that has obtained permission from the owner of the data for this purpose.

## 1. 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論

国立研究開発法人農業生物資源研究所及び群馬県蚕糸技術センターの共同により、平成27年8月6日付けで隔離飼育区画での飼育試験に関する承認申請のあった「高染色性絹糸生産カイコ（改変*Fibroin H, Bombyx mori*），中515号×GCS500（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）」について、生物多様性影響評価を行った。

本遺伝子組換えカイコは、カイコ由来のフィブロインH鎖遺伝子のうち、グリシン アラニンを主とする繰返し配列をコードする領域のほぼすべてを合成遺伝子に置換し、この遺伝子の発現により染色性を高めた生糸を生産する。また、本遺伝子組換えカイコは、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の改変緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現する遺伝子を導入することで眼において緑色蛍光を発し、これを選抜マーカーとして利用している。審査の概要は、本報告書の2のとおりである。

学識経験者からは、本遺伝子組換えカイコを承認申請のあった第一種使用規程に従って使用した場合に、生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であるとの意見を得ている。これらにより生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。なお、この隔離飼育区画試験においては、飼育管理手法の確立のための試験及び大規模飼育における飼育者のトレーニングを行うことも目的としている。

### (参考) これまでの審査経緯

日付	事項	備考
平成27年 8月10日	第一種使用規程承認申請受理	
平成27年10月19日	生物多様性影響評価検討会昆虫分科会における審査（第1回）	非公開
平成27年11月30日	生物多様性影響評価検討会昆虫分科会における審査（第2回）	非公開
平成27年12月24日	生物多様性影響評価検討会昆虫分科会における審査（第3回）	非公開
平成28年 2月15日	生物多様性影響評価検討会総合検討会における審査	公開
平成28年 2月26日	学識経験者からの意見提出	
平成28年 3月24日	審査報告書とりまとめ	

開発法人等の知的財産等が開示され特定の者に不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがあるため。

## 2. 審査の概要

本遺伝子組換えカイコは、導入した遺伝子の発現により、塩基性色素との結合性を高めた染色性の高い、また織度が細い生糸を生産する。また、本遺伝子組換えカイコを選抜するためのマーカーとして、カイコの眼において緑色蛍光を発する。導入した遺伝子は、絹糸を構成する主要な繊維タンパク質をコードするカイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のうち、グリシン アラニンを主とする繰返し配列をコードする領域のほぼすべてを、合成遺伝子に置換した改変 *Fibroin H* 遺伝子及び、オワンクラゲ由来の改変緑色蛍光タンパク質 (*EGFP*) 遺伝子である。なお、フィブロイン H 鎖遺伝子に置換した合成遺伝子はグリシンおよびグルタミン酸を主に含むアミノ酸配列をコードする。

本遺伝子組換えカイコの作出においては、*piggyBac* (イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来の転移因子) を使用して、これを改変した 2 種類のプラスミド (大腸菌 *Escherichia coli* 由来) を組み合わせて受精卵に顕微注入した。一つは *piggyBac* の末端配列に挟まれた転移酵素遺伝子を除去し、目的遺伝子を挿入したドナープラスミドであり、もう一つは *piggyBac* の末端配列のうちの片方を欠損させたヘルパープラスミドである。ヘルパープラスミドはカイコゲノム中に挿入されないが、同時に注入したドナープラスミド中の目的遺伝子を切り出してカイコゲノム中に挿入する転移酵素を供給する。

本遺伝子組換えカイコの作出の手順とその確認は、以下のとおりである。

はじめに、二化性の中国種系統であり、極細織度蚕品種「はくぎん」の親である中 514 号に、上記の *piggyBac* を使用して改変 *Fibroin H* 遺伝子の発現カセットと改変緑色蛍光タンパク質遺伝子発現カセットを染色体上に 1 コピー組み込んだ。

次に で組み込んだカイコを兄妹交配し、生まれたカイコ G1 世代から GCS500 系統を選抜・育成した。

最後に GCS500 系統の G5 世代からは中国種系統 中 515 号と交配し、交雑第 1 代を作出した。(2 つのホモ系統の交雑により、雑種強勢を最大限に引き出し、生産性、耐性等の生活力で優れたカイコが生ま出させるためである。)

目的遺伝子の伝達及び発現の安定性については、GCS 系統の複数世代及び GCS 系統と中国種系統の F1 についてサザンハイブリダイゼーション法及び繭の形質により確認されている。また、染色体上に *piggyBac* 転移酵素遺伝子が存在しないことが PCR 法により確認されている。

以上の本遺伝子組換えカイコに関し、生物多様性影響を生じさせる可能性のある性質である、(1) 競合における優位性、(2) 捕食性、(3) 有害物質の産生性、(4) 交雑性、の 4 つの項目について評価を行った。

### (1) 競合における優位性

宿主が属する生物種であるカイコは野生のクワコ (*Bombyx mandarina*)

を人為的に高度に家畜化した昆虫であり、我が国では弥生時代に養蚕が伝えられたと考えられており、長期間の飼育の歴史がある。これまでに日本を含めてカイコが野外に逸出して自然条件下で繁殖した例は報告されていない。カイコは、人間の管理が行き届かない自然条件下に放置された場合に以下の状態が観察される。

繭を作り始める直前の熟蚕に生長するまでは幼虫は動き回ることがなく、食草であるクワに自ら到達することができず、自力での生育は難しい。

野生種であるクワコとは異なり、胸部や頭部を細長く突き出す枝に擬態する行動や擬態のための体色や斑紋を欠いているため、桑樹において隠れることもできず、野鳥や昆虫に速やかに捕食される。

万一、成虫まで生育できたとしても、飛ぶことができないため、野鳥や昆虫に捕食される可能性が高く、かつ離れた場所にいるメス成虫にオス成虫は到達することができず、交尾・産卵する機会がほとんどない。

以上のことから、カイコは自然条件下で生存・繁殖する可能性は低い。

本遺伝子組換えカイコ及び対照の非遺伝子組換えカイコとの間で形態及び生育の特性（幼虫の体重、孵化歩合、幼虫の行動範囲、営繭率（繭を作った幼虫の割合）、産卵範囲、産卵数、繭重・繭層重、幼虫期間及び脱皮回数）を比較したところ、幼虫体重（2 齢期）及び産卵数については本遺伝子組換えカイコの方が非遺伝子組換えカイコに比べて統計学的に有意に小さく、幼虫体重（2 齢期以外）・産卵範囲・孵化歩合・営繭率・幼虫の行動範囲については本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で有意差は認められず、脱皮回数は 4 回と同等であった。繭重と繭層重については、それぞれ総重量を個数で割り 1 個当たりとして比較したところ、繭重は本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコで違いがなく、繭層重は本遺伝子組換えカイコの方が小さかった。繭糸繊度は本遺伝子組換えカイコの方が統計学的に有意に細かった。幼虫期間については、本遺伝子組換えカイコが 22 日、非遺伝子組換えカイコが 23 日で 1 日の違いがあったが、カイコの幼虫期間として特段の異常は認められなかった。これら生育特性の相違を示す調査結果は競合における優位性を高めることを示唆するデータではないと考えられた。

なお、本遺伝子組換えカイコは、改変 Fibroin H タンパク質を絹糸に含むが、このタンパク質は染色性を高めたり繊度を細くしたりするなど物性を改変するにすぎず、幼虫の運動性を高めたり成虫に飛翔能力を付与したりすることもないことから、カイコの競合における優位性を高めることはない。また、遺伝子組換え個体の選抜マーカーである EGFP は、幼虫や成虫の眼に緑色蛍光を付与するにすぎず、これらがカイコの競合における優位性を高めることは考え難い。

以上より、承認申請のあった所在地の隔離飼育区画において、限定された環境での一定の作業要領を踏まえた幼虫の飼育（3 齢幼虫期以降から繭の形成まで）並びに繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに

付随する行為の範囲内で本遺伝子組換えカイコを使用する限り、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

## (2)捕食性

カイコは、幼虫期に人為的に与えられた桑葉又は人工飼料のみを摂食して成長し、桑葉以外の植物や昆虫等を捕食することはない。また、カイコ幼虫の運動能力は著しく低く、飼育施設から野外に逸出して桑樹を登り、桑葉を摂食して生育した例はこれまで報告されていない。さらに、成虫は摂食や飲水は一切しない。

本遺伝子組換えカイコは、改変 Fibroin H タンパク質を絹糸に含むが、このタンパク質は染色性を高めたり繊維度を細くしたりするなど物性を改変するにすぎず、また、遺伝子組換え個体の選抜マーカーである EGFP も、幼虫や成虫の眼に緑色蛍光を付与するにすぎないため、これらのタンパク質がカイコ幼虫の食性に変化を与えることは考えられない。

以上より、承認申請のあった所在地の隔離飼育区画において限定された環境での一定の作業要領を踏まえた幼虫の飼育(3 齢幼虫期以降から繭の形成まで)並びに繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内で本遺伝子組換えカイコを使用する限り、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、捕食性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

## (3)有害物質の産生性

カイコは、弥生時代から日本国内で飼育されたと考えられているが、これまで野生動植物等の生息又は生育に悪影響を及ぼすような有害物質を産生しているとの報告はない。また、養蚕農家においては、飼育中に生じる桑葉等の残渣やカイコの糞・死体などを、敷地内に掘った穴や桑畑に廃棄することが一般的に行われているが、それらの排泄物等が野生動植物等に有害性をもたらしたとの報告もない。

我が国の閉鎖系実験施設において本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの糞や死体を土壤中に混合し、プロッコリーの発芽・生育や土壤微生物に与える影響を比較検討したところ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった。

本遺伝子組換えカイコで発現する改変 Fibroin H タンパク質及び EGFP それぞれについて、データベースで検索した結果、類似の既知の有毒タンパク質やアレルゲンのアミノ酸配列を持たないことから、捕食動物への影響は考え難い。また、改変 Fibroin H タンパク質は絹糸腺で発現するが、生糸の物性を改変するだけであり、EGFP は眼で発現するが、多くの生物の遺伝子組換えにおいて選抜マーカーなどとして用いられているものであり、タンパク質の特性から考えても、土壤中に混入した場合に他の生物に影響を与えるとは想定されない。

以上より、承認申請のあった所在地の隔離飼育区画において、限定された環境での一定の作業要領を踏まえた幼虫の飼育(3 齢幼虫期以降から繭の形成ま

で)並びに繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内で本遺伝子組換えカイコを使用する限り、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

#### (4)交雑性

カイコと交雑可能な近縁野生種としては、クワコとインドクワコ (*Bombyx huttoni*) が報告されているが、日本国内に分布している昆虫はクワコのみであり、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動物としてクワコを特定した。

カイコとクワコの間では、人為的に交尾させれば交雑個体が生じ、後代において妊性も確認されており、交雑性に関する具体的な影響としては、本遺伝子組換えカイコ由来の改変 *Fibroin H* 遺伝子及び改変緑色蛍光タンパク質遺伝子が当該交雑個体からクワコの集団に浸透し、定着する可能性が考えられた。

カイコとクワコは、メス成虫が放出する性フェロモン (ボンビコール) が同一であり、カイコのメス成虫が発した性フェロモンに誘引されてクワコのオス成虫が飛来し交尾する可能性が考えられる。

しかし、クワコのメス成虫は、歩行力・飛翔力ともにカイコのオス成虫より活発であり、カイコのオス成虫が接近すると逃げ回ること、クワコの交尾率が高い籠採り法 (風通しのよいざる籠の中にクワコのメス成虫とカイコのオス成虫を入れて交尾の可能性を調査した試験) においても、交尾が成立しないことから、カイコのオス成虫がクワコのメス成虫に到達して自然環境下で交尾することは考え難い。

また、北海道から鹿児島までの日本各地で採集したクワコと、カイコの様々な系統 (クワコ 4,192 個体とカイコ 147 系統) について、ミトコンドリアゲノムの CO (cytochrome c oxidase subunit) 遺伝子の遺伝的多型を解析したところ、クワコにはカイコのミトコンドリアゲノムが流入した痕跡は認められなかった。上記説明のとおり、交雑の可能性が考えられる組み合わせはクワコのオスとカイコのメスである。よって交雑第 1 代目のメス由来であるミトコンドリアゲノムは、カイコ由来と考えられるが、その痕跡が認められなかった。この結果から少なくとも、現在の養蚕の現場において、カイコとクワコの交雑は起きていないか、極めてまれであると考えられる。

さらに、カイコのメス成虫と野生のクワコのオス成虫の間で、交尾して交雑個体が生じたり繁殖したりする可能性について考察した。可能性としては、パイプハウス蚕室及びプレハブ蚕室及び飼育残渣中の 2 通りが考えられた。

パイプハウス蚕室及びプレハブ蚕室 (以下「各蚕室」という。) で本遺伝子組換えカイコのメス成虫が生じてクワコのオス成虫と交尾して交雑個体が生じたり繁殖したりする可能性について

各蚕室における本遺伝子組換えカイコの使用を 3 齢幼虫期以降から繭の形成までとしており、羽化する前に冷凍又は乾燥により繭中の蛹を不活化するほか、幼虫飼育中に出現した早熟個体はただちに取り除いて捕殺し、収繭後は室内を清掃して残っている繭や蛹はすべて回収して不活化することとしている。

また、各蚕室は内側全体又は開放する窓や戸に 4 mm 目以下の網が張られていることから、各蚕室外からクワコのオス成虫が侵入することはなく、桑葉に付着したクワコの幼虫や繭が持ち込まれても、カイコ幼虫とは体色や行動が異なり、繭も色・形状が異なることから、区別して捕殺することが可能であると考えられた。

もし、持ち込まれたクワコの幼虫又は繭が発見できず、クワコのオス成虫が各蚕室に生じた場合であっても、上述のとおりそもそも本遺伝子組換えカイコの飼育は 3 齢幼虫から繭の形成までであり、メス成虫が各蚕室で生じることがないため、両者が交尾することは考え難い。

その上で、万が一、各蚕室で本遺伝子組換えカイコのメス成虫とクワコのオス成虫が発生して交尾したとしても、本遺伝子組換えカイコのメス成虫は運動能力が低く、産卵範囲は非遺伝子組換えカイコと同等であること、窓等には網を張ることから各蚕室で休眠卵を産卵するに過ぎないこと、さらにこれら休眠卵が翌年 6 月までに孵化しても孵化幼虫の周囲には桑樹はないため、生存することはできない。

以上のことから、各蚕室で本遺伝子組換えカイコのメス成虫が生じてクワコのオス成虫と交尾して交雑個体が生じたり繁殖したりする可能性は極めて低いと考えられた。

飼育残渣中において本遺伝子組換えカイコのメス成虫が生じてクワコのオス成虫と交尾して交雑個体が生じたり繁殖したりする可能性について

飼育残渣を各蚕室から残渣処理室への運び出しには、事前に目視確認により繭及びカイコ（幼虫及び蛹）を取り除くこととしているほか、枝は束ね、枝以外の糞、葉等については飼育網に包み込んだ上で、運搬時のこぼれ落ちを防ぐため、幌を備えた運搬車でそれぞれ運搬することとしている。

残渣処理室に運搬した飼料残渣については、上簇から 7 日以内に速やかに粉砕機で粉砕し、本遺伝子組換えカイコを不活化することとしているが、予め、非遺伝子組換えカイコを使用して実施した試験では、繭を作らなかった蛹や繭を作るのが遅れた幼虫が見落とされて飼育残渣に混入したとしても、粉砕機による粉砕処理ですべて死亡した結果となった。このことから飼育残渣に混入した幼虫が成虫になることはないと考えられた。

また、粉砕が完了した飼育残渣は、隔離飼育外の堆肥盤に搬出して堆肥とし、所内で自家消費を行うこととしており、たとえ万が一、残渣中に卵が残ったとしても、休眠卵が完全に孵化する翌年の 6 月までに、堆肥盤において堆肥化されるため、孵化する可能性はないと考える。

さらに、万が一、本遺伝子組換えカイコとクワコが交雑したとしても、当

該交雑種は幼虫期に絹糸腺で改変 Fibroin H タンパク質を、眼で EGFP をそれぞれ発現するが、これらの形質が自然環境下での競合における優位性を高めるとは考え難く、その交雑個体が野生のクワコ集団において優占化する可能性は低いと考えられた。

以上より、承認申請のあった所在地の隔離飼育区画において、限定された環境での一定の作業要領を踏まえた幼虫の飼育（3 齢幼虫期以降から繭の形成まで）並びに繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内で本遺伝子組換えカイコを使用する限り、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

## (5) 結論

宿主が属する生物種であるカイコはクワコから高度に家畜化され、養蚕が行われており、我が国では長期間の飼育の歴史がある。これまでに日本を含めてカイコが野外に逸出して自然条件下で繁殖した例は報告されていない。

我が国の閉鎖系実験施設において、競合における優位性に関わる諸形質を調査した結果、差異が認められた形質によって本遺伝子組換えカイコの競合における優位性が高まることはないと考えられた。

なお、本遺伝子組換えカイコは、改変 Fibroin H タンパク質を絹糸に含むが、幼虫の運動性を高めたり成虫に飛翔能力を付与したりすることもなく、組換え個体の選抜マーカーである EGFP も、幼虫や成虫の眼に緑色蛍光を付与するにすぎず、競合における優位性を高めることは考えられない。

以上より、隔離飼育区画で使用する範囲内では、競合における優位性に起因して生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

カイコは、幼虫期に人為的に与えられた桑葉又は人工飼料のみを摂食して成長し、桑葉以外の植物や昆虫等を捕食することはない。また、カイコ幼虫の運動能力は著しく低く、飼育施設から野外に逸出して桑樹を登り、桑葉を摂食して生育した例はこれまで報告されていない。さらに、成虫は摂食や飲水は一切しない。

本遺伝子組換えカイコで発現する改変 Fibroin H タンパク質及び EGFP は、カイコ幼虫の食性に変化を与えないと考えられない。

以上より、隔離飼育区画で使用する範囲内では、捕食性に起因して生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

カイコは、これまで野生動植物等の生育に悪影響を及ぼすような有害物質を産生しているとの報告はなく、カイコの排泄物等が野生動植物等に有害性を示したとの報告もない。

改変 Fibroin H タンパク質及び EGFP は、類似の既知の有毒タンパク質やアレルゲンのアミノ酸配列を持たないことから、捕食動物への影響は考え難い。また、本遺伝子組換えカイコは、幼虫期に改変 Fibroin H タンパク質を絹糸腺で発現するほか、選抜マーカーとして EGFP を眼で発現するが、タンパク質としての特性から考えても、土壤中に混入した場合に他の生物に影響

を与えるとは想定されない。

以上より、隔離飼育区画で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因して生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

交雑性については、影響を受ける可能性のある野生動物としてカイコの近縁種のクワコを特定したが、カイコのオス成虫が歩行力、飛翔力ともにカイコのオス成虫より活発な野生のクワコのメス成虫に到達して自然環境下で交尾することは考えられないことから、各蚕室及び残渣処理室において、本遺伝子組換えカイコのメス成虫が生じてクワコのオス成虫と交尾して交雑個体が生じたり繁殖したりする可能性を考察したが、いずれも極めて低いと考えられた。また、クワコにカイコのミトコンドリアゲノムが流入した痕跡は認められなかったことから、少なくとも現在の養蚕の現場において、カイコとクワコの交雑は起きていないか、極めてまれであると考えられる。

さらに、万が一、本遺伝子組換えカイコのメス成虫と野生のクワコのオス成虫が交尾して交雑個体が生じたとしても、絹糸腺で改変 Fibroin H タンパク質を、眼で EGFP をそれぞれ発現するにすぎず、当該交雑種がクワコ集団において優占化するとは考え難い。

以上により、隔離飼育区画で使用する範囲内では、交雑性に起因して生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

以上を総括すると、本遺伝子組換えカイコを承認申請のあった所在地の隔離飼育区画において、限定された環境での一定の作業要領を踏まえた第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断した。

なお、この隔離飼育区画試験は、一般的な生産の申請の際に必要なとされる生産現場に近い形での飼育管理手法の確立のための試験及び大規模飼育における飼育者のトレーニングを行うことも目的として、第一種使用規程の承認の申請がなされたものである。

< 審查參考資料 >

## 資料 1. 第一種使用規程承認申請書

隔離飼育区画での試験飼育の承認を受けるために申請者から提出された申請書類

### 第一種使用規程承認申請書

平成 27 年 8 月 6 日

農林水産大臣 林 芳正 殿

環境大臣 望月 義夫 殿

氏名 国立研究開発法人農業生物資源研究所  
申請者 理事長 廣 近 洋 彦 印  
住所 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 番地 2

氏名 群馬県蚕糸技術センター  
申請者 所 長 須 関 浩 文 印  
住所 群馬県前橋市総社町総社 2 3 2 6 番地 2

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

資料 1. 第一種使用規程承認申請書

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>高染色性絹糸生産カイコ（改変 <i>Fibroin H, Bombyx mori</i>）（中 515 号×GCS500）</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>隔離飼育区画における幼虫の飼育（3 齢幼虫期以降から繭の形成まで）並びに繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>隔離飼育区画の所在地：群馬県前橋市総社町総社 2326 番地 2                  隔離飼育区画の名称：群馬県蚕糸技術センター                  遺伝子組換えカイコ飼育調査区画                  使用等期間：承認日から平成 33 年 3 月 31 日まで                  隔離飼育区画内の施設の内容：別に定める「隔離飼育区画の施設内容及び受容環境」のとおりとする。                  隔離飼育区画の要件：                  1 次に掲げる設備を有すること                  (1) 施設内への部外者の立入りを防止するため、遺伝子組換えカイコを隔離して飼育するための遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（以下「隔離飼育区画」という。）を取り囲むように金属製フェンス（高さ 1.8 m）を設置している。                  (2) 遺伝子組換えカイコを飼育する区画であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。                  (3) 隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室は鋼管による骨組みで、内側の網（4 mm 目以下）と外側のフィルムで二重に被覆している。外側のフィルムは、天井、妻面及び側面に開閉可能な部分があるが、内側の網は開閉しない（出入口を除く。）                  (4) 隔離飼育区画内のプレハブ蚕室は屋根、壁、戸及び窓を備え、開閉可能な窓、戸（出入口を除く。）及び換気口には 4 mm 目以下の網を張っている。                  (5) 隔離飼育区画内の残渣処理室は鋼管による骨組みで、全体を網（4 mm 目以下）で覆い、天井部外側をフィルムで被覆している。内側に網を保護する合板（高さ 0.9 m）を設置している。                  (6) 不活化処理で用いる冷凍庫（-30℃～-20℃設定）の設置は、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた区画とする。                  2 次に掲げる事項を遵守すること                  (1) 別に定める作業要領に従う。                  (2) 別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。                  (3) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。</p>

(別紙 1)

## 隔離飼育区画の施設内容及び受容環境

### 1 隔離飼育区画の所在地等

- (1) 名称：遺伝子組換えカイコ飼育調査区画
- (2) 住所：群馬県前橋市総社町総社 2326 番地 2
- (3) 電話番号：027-251-5145 (群馬県蚕糸技術センター)
- (4) 地図：図 1 及び図 2 を参照

### 2 責任者等

- (1) 隔離飼育区画において行う試験の責任者：主席研究員 岡野俊彦
- (2) 隔離飼育区画管理責任者：蚕糸研究係長 桑原伸夫

### 3 隔離飼育区画施設の概要

- (1) 隔離飼育区画全体の面積：1,700 m<sup>2</sup>
- (2) 隔離飼育区画内の施設の配置：図 3 を参照。
- (3) 隔離飼育区画内の施設の概要：
  - 1) パイプハウス蚕室
    - ・遺伝子組換えカイコの幼虫の飼育と繭の生産を行う。
    - ・7.2 m×39.6 m (面積 285 m<sup>2</sup>) ×3.8 m (高さ)。
    - ・外観は図 5、平面図は図 6 を参照。
    - ・遺伝子組換えカイコの飼育時は、内側全体に 4 mm 目以下の網を張るとともに、外側をフィルムで被覆する。
  - 2) プレハブ蚕室
    - ・遺伝子組換えカイコの幼虫の飼育と繭の生産を行う。
    - ・5.6 m×40 m (面積 224 m<sup>2</sup>) ×3.6 m (高さ)。
    - ・外観は図 7、平面図は図 8 を参照。
    - ・遺伝子組換えカイコの飼育時は、開閉可能な窓、戸 (出入口を除く。) 及び換気口には 4 mm 目以下の網を張るとともに、開けない戸は施錠し、閉切であることを示す表示を掲示する。
  - 3) 残渣処理室
    - ・飼育後の残渣を收容し、残渣の粉碎処理を行う。
    - ・5.4 m×27 m (面積 146 m<sup>2</sup>) ×2.9 m (高さ)。
    - ・外観は図 9、平面図は図 10 を参照。
    - ・全体を 4 mm 目以下の網で被覆し、内側に網を保護する合板 (高さ 0.9 m) を設置、天井部外側はフィルムで被覆する。
  - 4) 部外者への注意書き

## 資料 1. 第一種使用規程承認申請書

- ・ 隔離飼育区画の出入口に掲示する。

### 4 設備の仕様等

蚕室における幼虫の飼育は、1.5 m×1.8 m×0.6 m の枠に 2 mm 目の網を張った飼育台を、各蚕室で最大 20 台使用して行う。

### 5 隔離飼育区画の周辺環境

#### (1) 地形

隔離飼育区画の周辺は標高 130 m 程度の平坦な地形である。

#### (2) 周辺の土地利用状況

隔離飼育区画の周辺は畑・民家が散在している。隔離飼育区画から半径 1 km の範囲には群馬県蚕糸技術センターの桑園以外には桑園はない。

#### (3) 周辺の環境保護区の名称と隔離飼育区画からの位置

隔離飼育区画は、環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、自然環境保全地域等）ではない。また、最も近い自然保護地域は、妙義荒船佐久高原国定公園であり、隔離飼育区画から約 25 km である。

#### (4) 市町村が策定するハザードマップ上の位置づけ（策定されている場合）

前橋市の洪水ハザードマップでは浸水が想定される区域とはなっていない。

<http://www.city.maebashi.gunma.jp/kurashi/188/195/p009812.html>

前橋市の地震被害想定では、関東平野北西縁断層帯主部によるマグニチュード 8.1 の地震が起きた場合の震度は最大で 6 弱が予想されている。

<http://www.city.maebashi.gunma.jp/kurashi/188/195/p006450.html>

#### (5) 台風の襲来歴

隔離飼育区画のある関東地方への過去 10 年間の台風の接近数を表 1 に示す（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページ）。

[http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto\\_koshin.html](http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html)

表1. 関東地方への過去10年間の台風の接近数

台風が中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署等から300 km以内に入った場合。なお、接近は2か月にまたがる場合があり、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しない。

年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	年間
2014							1	1		2			4
2013									1	2			3
2012						1			1	1			2
2011							1		1				2
2010								1	1	1			3
2009								2	1	2			4
2008								1	1				2
2007							1		1	1			3
2006								1					1
2005							1	1	1				3

## 6 隔離飼育区画周辺の生物相

### (1) 隔離飼育区画での遺伝子組換えカイコ飼育により影響を受ける可能性のある野生動植物の生態

影響を受ける可能性のある野生動物としてクワコが想定される。群馬県蚕糸技術センター内の桑園のクワ及び周辺に自生するクワに生息するクワコの幼虫や繭が見られる。また、群馬県下仁田町に、カイコ雌成虫をフェロモン源とするフェロモントラップを設置すると、6月から11月までの間、クワコのオス成虫が捕獲されている（生物多様性影響評価書の別添3を参照）。

### (2) 野外におけるカイコ（鱗翅目昆虫）の幼虫を捕食又は寄生すると考えられる鳥類・昆虫類

生物多様性影響評価書の別添5に、群馬県前橋市において鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生すると考えられる野生の鳥類・昆虫類を挙げている。

### (3) クワの生育状況

群馬県蚕糸技術センターの桑園（約6.7 ha）にクワが植えられているほか、同センター内及び周辺の半径1 kmにおいて、実生等により自生するクワが散在している。



図1. 群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画周辺の地形図（Google マップより）

赤く囲んだところがセンターの敷地（図2を参照）



図2. 群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画の位置

(図1で赤く囲んだ部分の拡大)

赤：隔離飼育区画

青：卵の保管、稚蚕の飼育、繭の不活化等を行う第二種使用の施設

緑：桑園（面積：合計約6.7ha）

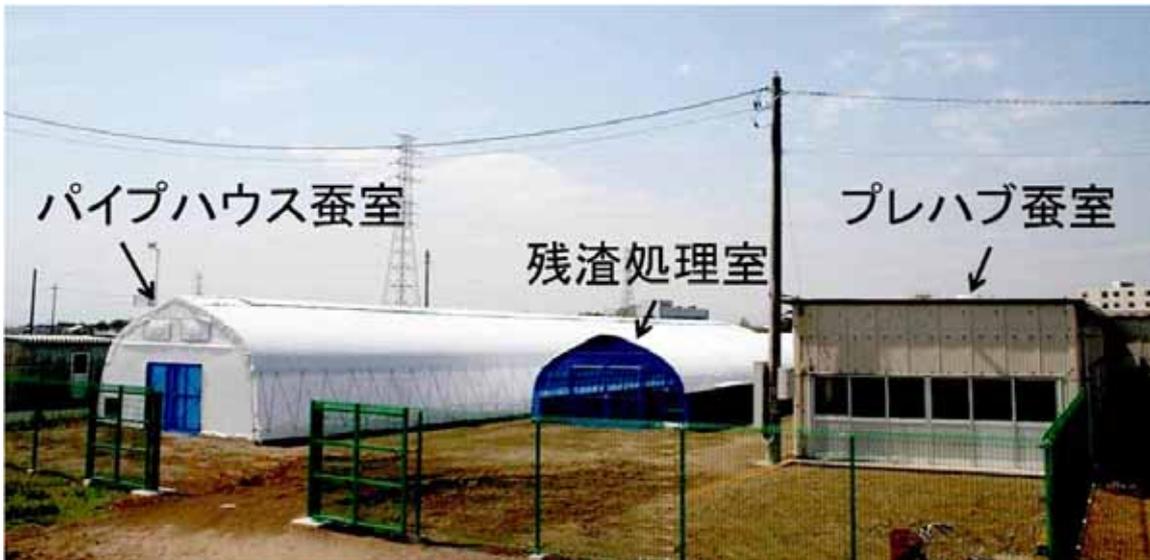
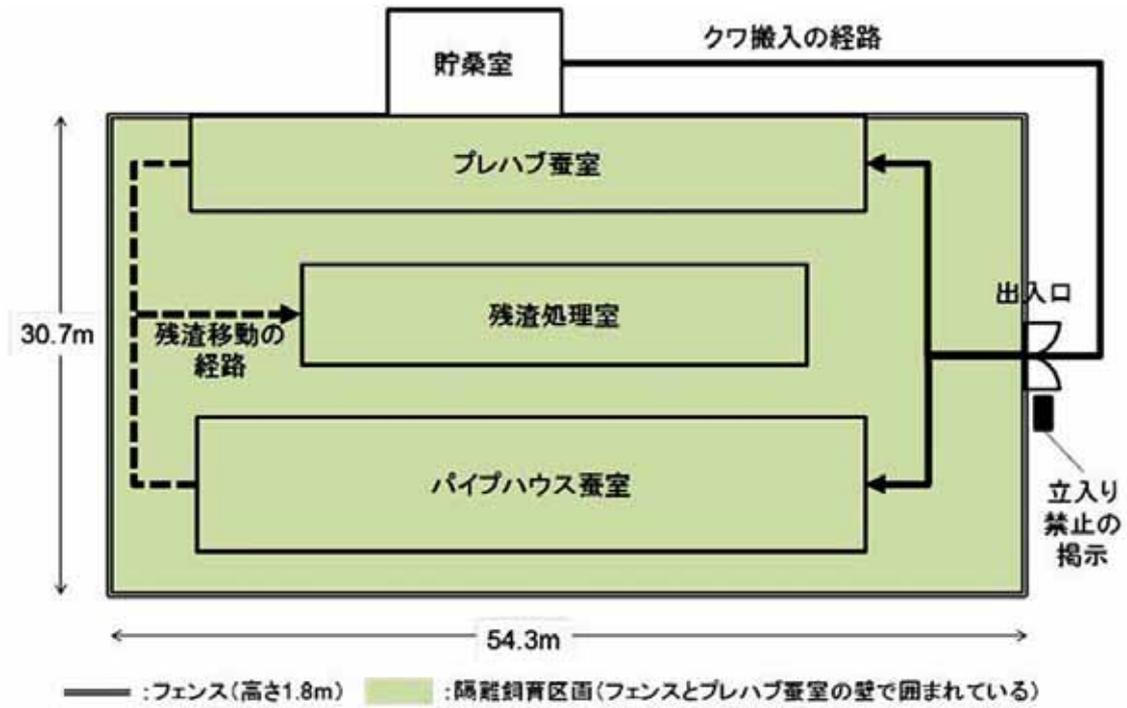


図3. 隔離飼育区画内の施設の概要

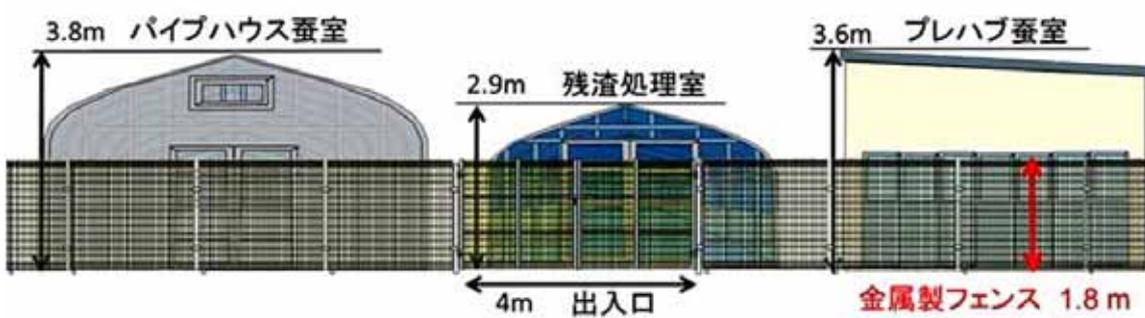


図4. 隔離飼育区画を囲むフェンス

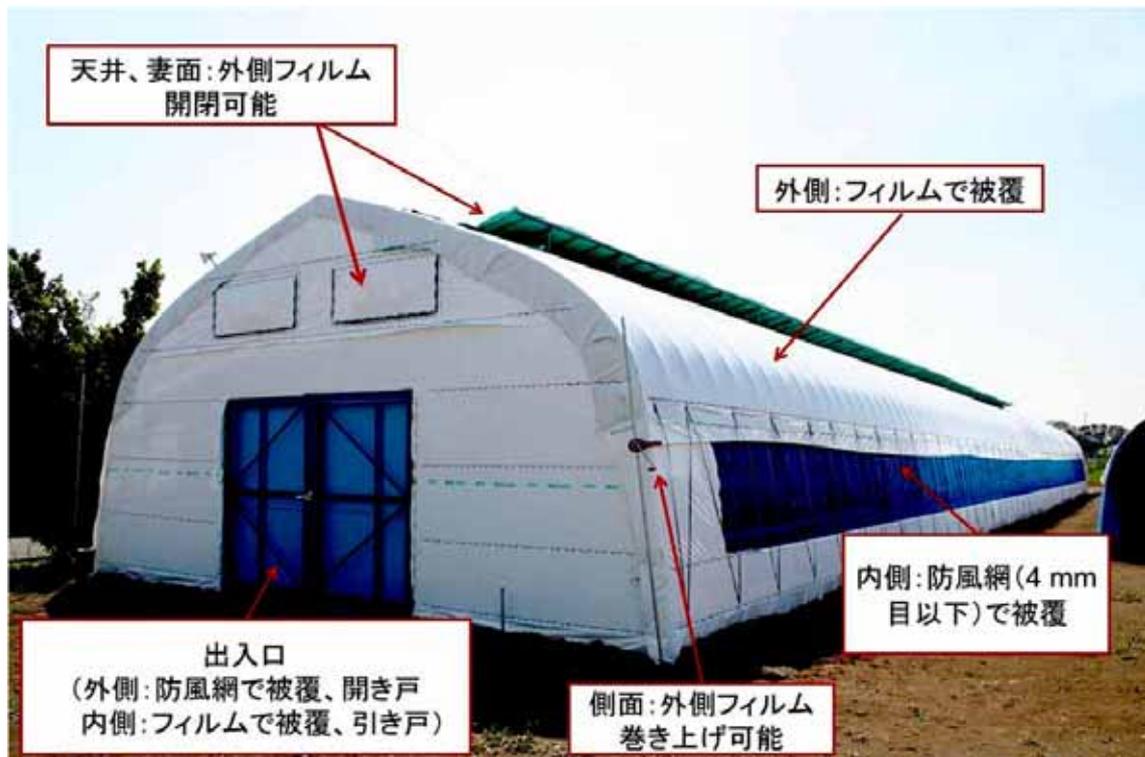


図5. 隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室

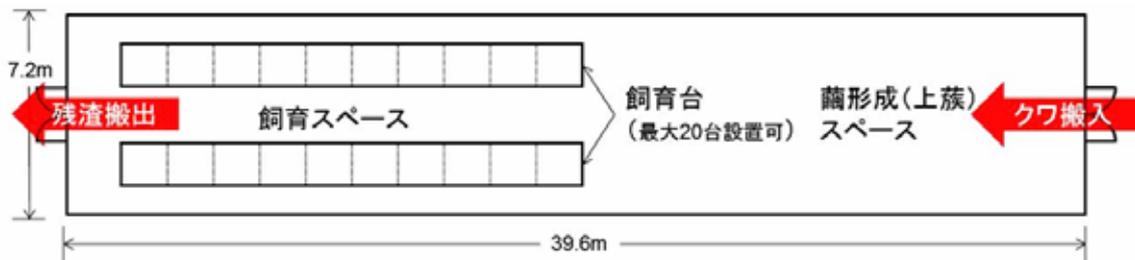


図6. 隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室の平面図



図7. 隔離飼育区画内のプレハブ蚕室

黄色で示した壁面を隔離飼育区画の境界とするため、窓及び戸は閉切とし（赤の×）、青で示した位置に金属製フェンス（高さ1.8m）を設置する。写真の撮影位置は図8を参照。

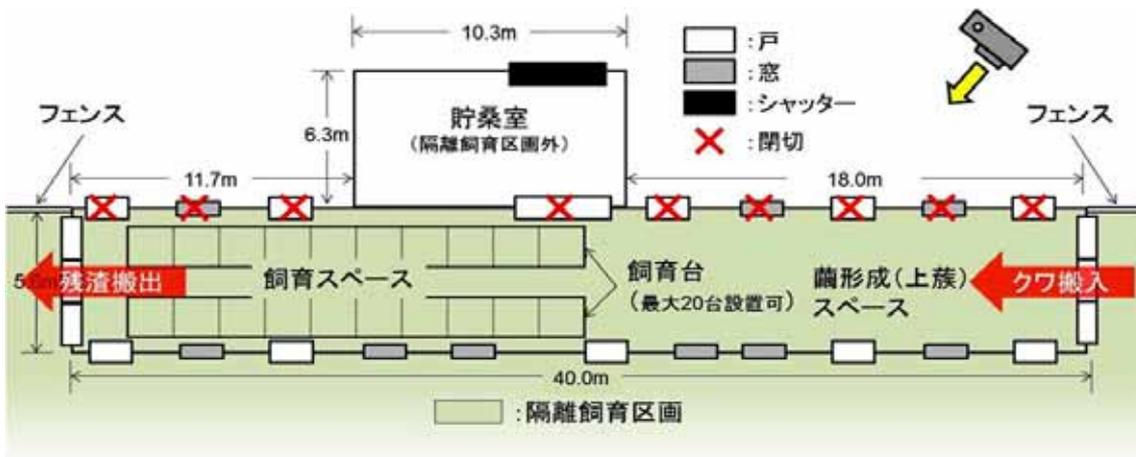


図8. 隔離飼育区画内のプレハブ蚕室の平面図

開閉可能な窓、戸（出入口を除く。）及び換気口には4mm目以下の網を張る。右上の黄色矢印は図7の写真を撮影した位置。また、飼育時に開閉しない戸は施錠し、閉切であることを示す表示を掲示する。

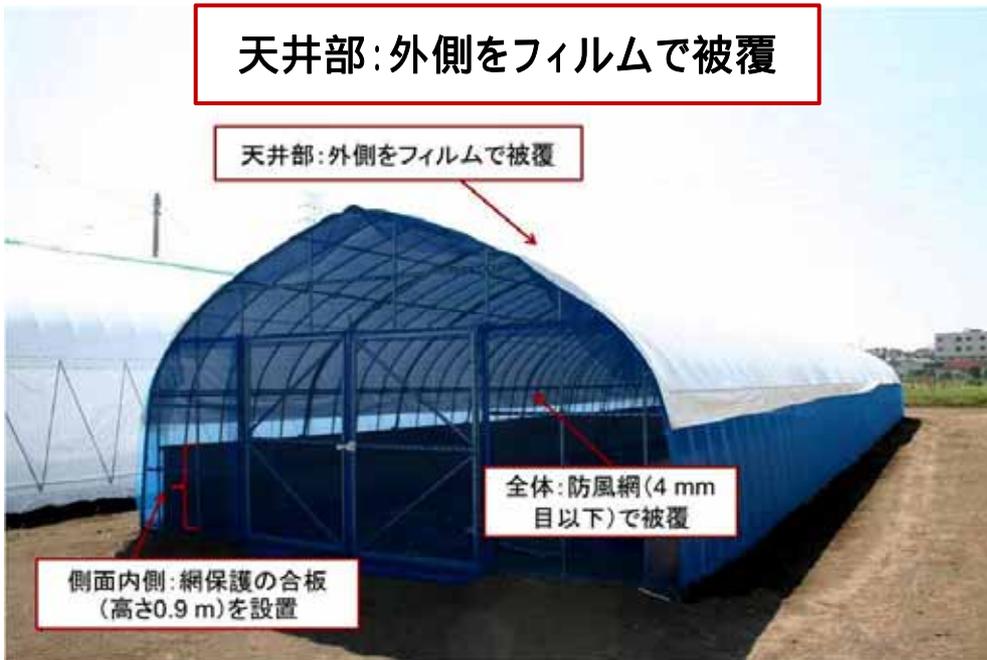


図9. 隔離飼育区画内の残渣処理室

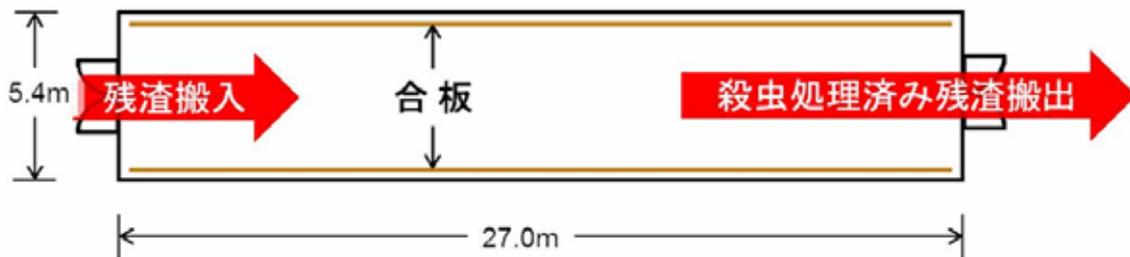


図10. 隔離蚕室区画内の残渣処理室の平面図

全体を4 mm 目以下の網で被覆し、内側に網を保護する合板(高さ0.9 m)を設置、天井部外側はフィルムで被覆

(別紙 2)

## 作業要領

### 1. 共通事項

- ・群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（別紙 1 図 2、以下「隔離飼育区画」という。）への部外者の立入りを防止するため、作業時以外は隔離飼育区画の出入口（別紙 1 図 3 上及び図 4）を施錠すること。
- ・隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室（別紙 1 図 5 及び図 6）、プレハブ蚕室（別紙 1 図 7 及び図 8）及び残渣処理室（別紙 1 図 9 及び図 10）の出入口は入退室時以外は閉鎖するとともに、偶発的に開放されることを防止するため、作業時以外は施錠すること。
- ・設備が本来有すべき機能が十分に発揮される状態を保持すること。
- ・施設の維持管理を適切に行うとともに、これらに変更がある場合には、別に定める様式により速やかに報告すること。
- ・一連の作業を通じて、遺伝子組換えカイコの環境中への曝露を極力減らすよう留意すること。

### 2. 遺伝子組換えカイコの飼育

- (1) 高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H, Bombyx mori*）（中 515 号×GCS500）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）の隔離飼育区画内における飼育頭数は必要最小限に抑える。
- (2) 本遺伝子組換えカイコの幼虫の飼育及び繭の生産は、隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室及びプレハブ蚕室（以下合わせて「各蚕室」という。）で行う。
- (3) 本遺伝子組換えカイコを隔離飼育区画内に搬入する場合、及び、隔離飼育区画の外に運搬し又は保管する場合は、蓋を固定すること等により本遺伝子組換えカイコが逸出しない構造の容器に入れるとともに、取扱いに注意を要する旨を容器の見やすい箇所に表示する。
- (4) 本遺伝子組換えカイコの隔離飼育区画での飼育は 3 齢幼虫期以降から繭の形成までとする。
- (5) 本遺伝子組換えカイコの卵を孵化させるまでの保管は、カルタヘナ法に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた生理研究蚕室又は蚕種保護室・壮蚕研究蚕室（別紙 1 図 2）において行う。
- (6) 隔離飼育区画に運び込むまでの本遺伝子組換えカイコの幼虫の飼育は、カルタヘナ法に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた蚕種保護室・壮蚕研究蚕室（別紙 1 図 2）において行い、(3) に従って隔離飼育区画に運び込む。
- (7) 隔離飼育区画で作られた繭は、絹糸の特性や織物への加工法等についての研究に供するため、カルタヘナ法に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた育蚕蚕室（別紙 1 図 2）まで、(3) に従って運搬し、冷凍庫を用いて  $-30^{\circ}\text{C}$ ～ $-20^{\circ}\text{C}$  で 24 時間以上凍結することにより不活化する。不活化された蛹及び生糸くずについては飼料等として流通しないように一般廃棄物収集運搬業者に委託して事業系一般廃棄物として焼却処理する。
- (8) 早熟個体等の生育異常のカイコ（本遺伝子組換えカイコ及びこれと同時に飼育している非遺伝子

## 資料1. 第一種使用規程承認申請書

組換えカイコを含む。以下同じ。)及び各蚕室又は残渣処理室内に侵入したクワコを発見した場合は、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、(7)に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。

- (9) 熟蚕（繭を形成する前に摂食を停止した幼虫）の割合を目視で確認し、1割程度以上となったと判断した場合に、繭を形成させるために、その日のうちにすべての幼虫を簇（繭を形成させる器具）に移動させて上簇とする。熟蚕の割合が1割程度に達する前に繭の形成を始めた幼虫は、必要に応じて個別に回収して簇に移動させる。なお、簇に移動させた後に繭を形成した幼虫の割合が低い等、2日に分けて幼虫を簇に移動させた方がよいと判断された場合は、その後の飼育では、1日目は熟蚕を簇に移動させ、2日目に残りの幼虫すべてを簇に移動させる等の措置を執る。
- (10) 他の遺伝子組換えカイコ系統と同じ蚕室内で同時に飼育する場合は、簇から落下したカイコは簇には戻さず、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、(7)に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。なお、必要に応じて、回収したカイコを4mm目以下の網で覆って繭を作らせた後に(7)に従って不活化する。
- (11) 繭を形成させた後には各蚕室内の清掃及び点検を徹底し、繭や蛹が発見された場合はすべて回収し、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、(7)に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。
- (12) 意図せずに本遺伝子組換えカイコが隔離飼育区画の外に持ち出されることを防止するため、各蚕室で作業を行う際には、専用の作業着及び履物を着用する。各蚕室での作業をすべて終えた際には、衣服等にカイコが付着していないことを原則として2人で相互に目視で確認するとともに、各蚕室内で着替え、当該作業着及び履物を各蚕室内に保管する。さらに、隔離飼育区画から出る前にも、同様に目視で確認する。カイコが付着していた場合は、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、(7)に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。
- (13) 隔離飼育区画で使用した機械や器具は、作業終了後、カイコが付着していないことを目視で確認することにより、意図せずに本遺伝子組換えカイコが隔離飼育区画の外に持ち出されることを防止する。カイコが付着していた場合は、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、(7)に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。また、隔離飼育区画の入口から各蚕室まで桑葉を運び込む経路と、各蚕室から残渣処理室への経路を交叉させないことで、桑葉を隔離飼育区画内に搬入する機械にカイコが付着するリスクを減少させる（別紙1図3）。

### 3. 飼育残渣の処理

- (1) 飼育残渣を各蚕室から残渣処理室に運び出す前に、各蚕室内で目視確認により、繭及びカイコ（幼虫及び蛹）を取り除く。
- (2) 飼育残渣のうち、枝については束ねた上で、枝以外の糞や葉等については飼育網に包み込んだ上で、運搬時のこぼれ落ちを防ぐため、幌を備えた運搬車でそれぞれ残渣処理室に運搬する。
- (3) 飼育残渣を運搬した後は、その経路（別紙1図3）を目視で確認し、繭及びカイコ（幼虫及び蛹）

## 資料 1. 第一種使用規程承認申請書

が落ちていた場合は、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、2. (7) に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。

- (4) 残渣処理室に運搬した飼育残渣は、上簇から 7 日以内に速やかに粉砕機で粉砕することにより、含まれている可能性があるカイコの幼虫や蛹を殺虫処理して不活化する。飼育残渣の粉砕はビニールシート上で行い、粉砕処理前にこぼれ落ちた飼育残渣を回収して、確実に粉砕する。
- (5) 不活化が完了した飼育残渣は、隔離飼育区画外の堆肥盤に搬出して堆肥とし、群馬県蚕糸技術センター内で自家消費する。
- (6) 各蚕室への桑葉の搬入と飼育残渣の移動は別の日に行う。

## 資料2. モニタリング計画書

### モニタリング計画書

平成27年 8月 6日

氏名 国立研究開発法人農業生物資源研究所  
申請者 理事長 廣 近 洋 彦 印  
住所 茨城県つくば市観音台2丁目1番地2

氏名 群馬県蚕糸技術センター  
申請者 所 長 須 関 浩 文 印  
住所 群馬県前橋市総社町総社2326番地2

#### 1 実施体制及び責任者

現時点での実施体制及び責任者は以下の通りである。

実施体制

【個人情報につき非開示】\* 国立研究開発法人農業生物資源研究所  
遺伝子組換え研究センター

【個人情報につき非開示】 国立研究開発法人農業生物資源研究所  
遺伝子組換え研究センター

【個人情報につき非開示】 群馬県蚕糸技術センター 蚕糸研究係

(\*責任者)

#### 2 モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称

クワコ (*Bombyx mandarina*)

#### 3 モニタリングを実施する場所

本申請における本遺伝子組換えカイコの使用は群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（以下「隔離飼育区画」という。）に限られる。万一、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコが交雑するとしても、その可能性は、本遺伝子組換えカイコのメス成虫に野生のクワコのオ

## 資料2. モニタリング計画書

ス成虫が飛来して交尾する場合に限られる上、本遺伝子組換えカイコのメス成虫はまったく飛翔できず歩きながら近くに産卵するにすぎない。したがって、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの交雑個体が生じて生育し、繭から成虫が羽化する可能性があるのは、本申請における隔離飼育区画の周辺に限られる。そのため、隔離飼育区画の周辺から飛び立った成虫を確実に捕獲するには、隔離飼育区画の周辺においてモニタリングすることが最適である。

なお、隔離飼育区画からもっとも近い桑園は隔離飼育区画の西側に接しており、面積は約 6.7 ha である。

以上のことから、隔離飼育区画の四隅の外側においてモニタリングを実施する。

### 4 モニタリングの期間

これまでの調査結果から、群馬県において野生のクワコ成虫が発生するのは、6 月中旬から 11 月下旬である（生物多様性影響評価書の別添3）。本申請に係る使用を5月から開始したと想定すると、本遺伝子組換えカイコとクワコが交雑した場合に交雑個体が成虫となるのは、その年の夏以降となる。また、9月から開始したと想定すると、交雑個体が成虫となるのは翌年の6月以降となる。したがって、交雑個体の発生状況を調査するためのモニタリングは、本申請に係る使用を開始する時期から想定される交雑個体の成虫発生時期に応じて開始することが適切である。一方、隔離飼育区画がある地区でのクワコの発生状況を調査しておくことは、生物多様性影響の可能性をあらかじめ検討する上で意義があることから、本申請に係る飼育で飼育残渣を廃棄する時からフェロモントラップを設置することとし、フェロモントラップの設置は6月中旬から11月下旬までとする。また、本申請に係る使用を終了した場合、その翌年11月下旬をもってモニタリングを終了する。

### 5 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

1) クワコを捕獲する方法としては、カイコのメス成虫又は合成した性フェロモン（ボンビコール）を誘引源としてクワコのオス成虫を誘引し、粘着板で捕獲するフェロモントラップが効率的である（別添3）。また、本遺伝子組換えカイコがクワコと交雑する可能性も、本遺伝子組換えカイコのメス成虫の放出する性フェロモンに誘引されたクワコのオス成虫が飛来することによるのであり、カイコのメス成虫又は合成した性フェロモンを用いたフェロモントラップは、これと同じ現象を再現することとなる。以上のことから、本申請に係る使用に伴うモニタリングにも、この手法を採用する。

また、これまでのフェロモントラップによる野生のクワコの発生状況調査として、2週間に1回程度の調査で季節的な消長を確認することができていることから、フェロモントラップの交換の頻度も2週間に1回程度以上とする。

以上のことから、本申請における隔離飼育区画での本遺伝子組換えカイコの飼育期間、2週間に1回程度以上の頻度で、隔離飼育区画の四隅の外側に、カイコのメス成虫又は合成した性フェロモンをフェロモン源として粘着板によるトラップを設置する。

## 資料2. モニタリング計画書

2) 本遺伝子組換えカイコが野生のクワコと交雑して、供与核酸を持つ交雑個体が生じているかどうかは、PCR法又はサザンハイブリダイゼーション法を用いて改変 *Fibroin H* 遺伝子を保有しているかどうかを検定することで確認することができる。

以上のことから、トラップにクワコが捕獲された場合は、導入した改変 *Fibroin H* 遺伝子を保有しているかどうかをPCR法又はサザンハイブリダイゼーション法により検定する。

### 6 緊急措置を実施する場合のモニタリングの強化

緊急措置計画書に定めるモニタリングの強化を実施する場合には、隔離飼育区画の周囲や、群馬県蚕糸技術センターの桑園、またはその周辺において、フェロモントラップを設置することとなる。フェロモントラップの設置位置については、緊急措置の内容によって検討する。

まず、緊急措置計画書の「4 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が意図せず生じた場合の具体的な措置の内容 (1) 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が観察された場合」においては、隔離飼育区画の外側に10 m以下の間隔で設置することとしている。

次に、同「4 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が意図せず生じた場合の具体的な措置の内容 (2) 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が継続的に観察された場合」においては、群馬県蚕糸技術センターの桑園の中央に1ヶ所及び当該桑園の周囲に30 m以下の間隔で設置するほか、隔離飼育区画の周囲500 m以内に認められる桑樹またはその周辺で設置可能な場所に設置する。

同「5 気象災害等が発生した場合の具体的な措置の内容 (1) 隔離飼育区画内の蚕室に被害が生じた場合」または同「(2) 隔離飼育区画内の残渣処理室に被害が生じた場合」のうち、倒壊した蚕室等の断片等が隔離飼育区画外に認められ、その周辺にクワが生育している場合においては、その場所またはその周辺で設置可能な場所に設置する。

なお、フェロモントラップの構造や設置期間については5と同様とする。

### 7 モニタリング結果の解析方法

検定結果をもとに、本遺伝子組換えカイコとクワコとの自然交雑率を調べる。

### 8 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告方法

モニタリング及びその解析結果は、場所を指定しない本遺伝子組換えカイコの第一種使用規程の最終申請時に、農林水産大臣及び環境大臣への報告書として添付する。

### 9 その他必要な事項

養蚕農家等で飼育しているカイコと野生のクワコとの交雑の可能性について、最新の研究成果や知見を収集し、生物多様性影響を防止するための管理措置やモニタリングの手法の改善に活用する。

隔離飼育区画において本遺伝子組換えカイコを飼育している期間及び飼育残渣を残渣処理室に

## 資料2. モニタリング計画書

保管している期間は、飼育しているカイコの生育状況、退出時に確認する衣類等へのカイコの付着の有無、交雑防止のための網等の管理状況、保管している飼育残渣からの成虫の発生の有無等を、各作業終了時に記録する。

モニタリング期間中に捕獲されたクワコ中に本遺伝子組換えカイコとの交雑によって、当該遺伝子の移行あるいは移行したと疑われる結果が得られた場合には、農林水産省及び環境省と協議を行うものとする。

## 資料3. 緊急措置計画書

### 緊急措置計画書

平成27年 8月 6日

氏名 国立研究開発法人農業生物資源研究所  
申請者 理事長 廣近 洋彦 印  
住所 茨城県つくば市観音台2丁目1番地2

氏名 群馬県蚕糸技術センター  
申請者 所長 須関 浩文 印  
住所 群馬県前橋市総社町総社2326番地2

第一種使用規程の承認を申請している高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H, Bombyx mori*）（中515号×GCS500）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置を執ることとする。

#### 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

本計画書の末尾に記載する国立研究開発法人農業生物資源研究所カイコ業務安全委員会（以下「生物研業務安全委員会」という。）の指示の下、具体的な緊急措置は以下の体制で実施する。

（平成27年8月現在）

実験・業務等安全主任者	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
実験・業務等責任者	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
実験・業務等従事者	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係

### 資料3. 緊急措置計画書

- 〃 【個人情報につき非開示】 群馬県蚕糸技術センター 技術支援係
- 〃 【個人情報につき非開示】 群馬県蚕糸技術センター 技術支援係
- 〃 【個人情報につき非開示】 前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合
- 〃 【個人情報につき非開示】 前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合
- 〃 【個人情報につき非開示】 前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合
- 〃 【個人情報につき非開示】 前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合

(以上は現時点での体制及び責任者であり、異動や所内での業務体制の見直しによる変更の際には適切な対応を行う。)

## 2 第一種使用等の状況の把握の方法

### (1) 本遺伝子組換えカイコと野生のクワコとの交雑個体の発生の有無

本申請におけるモニタリング計画書に基づき、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの交雑個体の発生の有無を確認し、その結果を生物研業務安全委員会及び群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換え実験・業務等安全委員会（以下「群馬安全委員会」という。）に報告する。

### (2) 気象災害等による隔離飼育区画の設備等の被害状況

気象災害等が発生した場合は、業務従事者は速やかに群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（以下「隔離飼育区画」という。）の設備等の被害状況及び隔離飼育区画の外への本遺伝子組換えカイコの逸出の有無を確認し、その結果を生物研業務安全委員会及び群馬安全委員会に報告する。

## 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

科学的根拠に基づき、本遺伝子組換えカイコの使用に伴い、生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、生物研業務安全委員会及び群馬安全委員会で内容について確認を行い、業務従事者にその旨を直接口頭で伝え、本件に関する事実を記録する。また、直ちにその内容を周知するために隔離飼育区画のある自治体に電話、ファックス、電子メール、文書などにより連絡する。さらに必要に応じて本件についてホームページ等で周知する。

## 4 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が意図せず生じた場合の具体的な措置の内容

### (1) 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が観察された場合

フェロモントラップを用いたモニタリング等の結果、本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が観察された場合は、隔離飼育区画での本遺伝子組換えカイコの飼育を当面中断し、遺伝子組換えカイコ及びこれと同時に飼育している非遺伝子組換えカイコの幼虫、繭（蛹）、飼育残渣等は、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた施設（以下「拡散防止措置が講じられた施

### 資料3. 緊急措置計画書

設」という。)にある冷凍庫を用いてすべて不活化する。当該施設に運搬するまでは、2重のビニール袋に密封して、取扱いに注意を要する旨を見やすい箇所に表示し、窓や戸等をすべて閉めた蚕室内又は残渣処理室内で保管する。運搬の際は、蓋を固定すること等により本遺伝子組換えカイコが逸出しない構造の容器に入れるとともに、取扱いに注意を要する旨を容器の見やすい箇所に表示する。

また、隔離飼育区画での使用における作業日ごとの記録を確認するとともに、交雑個体の発生数・発生時期等を考察することにより、本遺伝子組換えカイコとクワコとが交尾して、その交雑個体が生存した経緯を明らかにする。

さらに、上述の措置と合わせてモニタリングを強化する。具体的には、隔離飼育区画の外側に10 m以下の間隔で、クワコの成虫が発生する6月から11月まで、フェロモントラップを常時設置して、可能な限り多くのオス成虫を捕獲する。捕獲したオス成虫については、本遺伝子組換えカイコとの交雑の有無を、PCR法を用いた改変 *Fibroin H* 遺伝子の検出により検定する。

合わせて、クワコ以外の野生生物の生物多様性への影響を抑えつつ、野生のクワコ集団への導入遺伝子の浸透を防止するため、害虫防除の専門家の助言を受けながら、実施可能なあらゆる措置を排除せずに計画を策定し、農林水産省及び環境省と協議する。

最初に交雑個体が観察されてから30日以内に観察された交雑個体については、最初の観察と同一の事象とし、30日後以降に新たに交雑個体が観察された場合は、交雑個体が継続的に観察されたとして次の(2)に移行する。30日後から1年後までに新たな交雑個体が観察されない場合は、通常のモニタリングに移行する。

#### (2) 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が継続的に観察された場合

フェロモントラップを用いたモニタリング等の結果、本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が最初に観察されてから30日後から1年後までに新たな交雑個体が観察され、交雑個体が継続的に観察されたと考えられた場合は、農林水産省及び環境省と協議の上、さらに数年継続してモニタリングを実施するものとする。

また、クワコ以外の野生生物の生物多様性への影響を抑えつつ、野生のクワコ集団への導入遺伝子の浸透を防止するため、(1)で策定した計画を実施する。

考えられる措置として、まず交雑個体の幼虫については、隔離飼育区画の周辺でクワが多く生育しているのは群馬県蚕糸技術センターの桑園であることから、ここに殺虫剤を散布するほか、必要に応じて、当該桑園のすべてのクワを剪定すること等により、幼虫の生育を防止する。交雑個体の成虫については、隔離飼育区画及び群馬県蚕糸技術センターの桑園やその周辺に集中的にフェロモントラップを設置すること等による捕殺や交信かく乱により、後代の発生を抑制する。

なお、モニタリングによって捕獲した個体については、遺伝子型の検査に用いる標本とするために、拡散防止措置が講じられた施設においてエタノールに浸漬するか、冷凍庫で凍結することにより不活化される。

## 5 気象災害等が発生した場合の具体的な措置の内容

### (1) 隔離飼育区画内の蚕室に被害が生じた場合

隔離飼育区画内の蚕室で本遺伝子組換えカイコを飼育している際に、気象災害等により蚕室が倒壊するなどの被害が発生して、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの接触を防止することが困難な場合は、本遺伝子組換えカイコの使用を直ちに中止し、本遺伝子組換えカイコを4の(1)に沿って不活化する。

倒壊した蚕室の断片等が隔離飼育区画外に出た場合には、飼育中の本遺伝子組換えカイコも同様に隔離飼育区画外に出ていることが想定されるため、断片等が確認された場所を中心に探索し、カイコがいれば回収して4の(1)に沿って不活化する。その際、蚕室の断片が広範囲に飛散する場合も想定し、実際の被害状況に応じて必要な範囲を探索してカイコを回収する。なお、カイコの幼虫は餌がなくなっても移動せず、自ら桑樹を登って摂食することもできないことや、野外では鳥類や他の昆虫類等に速やかに捕食されることから、人間の管理が行き届かない野外で生存・繁殖することは考えにくい。そのため、隔離飼育区画外に出たとしてもクワコとの交雑個体が生じることは考えにくい。念のため、交雑個体が生じていないかを確認するため、倒壊した蚕室の断片等が確認された場所やその周辺にクワコが生育していればモニタリングを実施し、4に沿って対応する。

### (2) 隔離飼育区画内の残渣処理室に被害が生じた場合

隔離飼育区画内の残渣処理室で、本遺伝子組換えカイコを飼育した後の飼育残渣を保管している際に、気象災害等により残渣処理室が倒壊するなどの被害が発生して、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの接触を防止することが困難な場合は、残渣処理室での飼育残渣の管理を直ちに中止し、飼育残渣に含まれる可能性がある本遺伝子組換えカイコを4の(1)に沿って不活化する。

倒壊した残渣処理室の断片等が隔離飼育区画外に出た場合には、(1)に沿って対応する。

### (3) 隔離飼育区画外に本遺伝子組換えカイコが逸出した場合

隔離飼育区画の外に本遺伝子組換えカイコと考えられるカイコが確認された場合は、当該カイコを速やかに回収し、拡散防止措置が講じられた施設にある冷凍庫を用いてすべて不活化する。運搬の際は、蓋を固定すること等により当該カイコが逸出しない構造の容器に入れるとともに、取扱いに注意を要する旨を容器の見やすい箇所に表示する。また、4の(1)に沿ってモニタリングを強化する。

## 6 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体の観察、若しくは気象災害等による本遺伝子組換えカイコの隔離飼育区画外への逸出等、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、又は、生物研業務安全委員会及び群馬安全委員会が必要と判断した場合は、緊急措置を講じた後、速やかに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

### 資料3. 緊急措置計画書

#### 生物多様性影響の防止に関する事項について検討するための委員会の委員名簿

国立研究開発法人農業生物資源研究所のカイコ業務安全委員会は、以下の委員で構成される。

##### 委員長

【個人情報につき非開示】 研究主幹（業務管理責任者）

##### 委員

【個人情報につき非開示】 昆虫科学研究領域（業務管理主任者）  
【個人情報につき非開示】 遺伝子組換え研究センター  
【個人情報につき非開示】 遺伝子組換え研究センター  
【個人情報につき非開示】 知的財産室  
【個人情報につき非開示】 遺伝子組換え研究センター  
【個人情報につき非開示】 遺伝資源センター  
【個人情報につき非開示】 遺伝資源センター  
【個人情報につき非開示】 昆虫科学研究領域  
【個人情報につき非開示】 動物科学研究領域  
【個人情報につき非開示】 農業環境技術研究所  
【個人情報につき非開示】 （一財）大日本蚕糸会 蚕業技術研究所  
【個人情報につき非開示】 群馬県農政部  
【個人情報につき非開示】 群馬県蚕糸技術センター  
【個人情報につき非開示】 広報室  
【個人情報につき非開示】 遺伝子組換え研究センター  
【個人情報につき非開示】 技術支援室  
【個人情報につき非開示】 安全管理室

群馬県蚕糸技術センターの遺伝子組換え実験・業務等安全委員会は、以下の委員で構成される。

##### 委員長

【個人情報につき非開示】 群馬県蚕糸技術センター 主席研究員

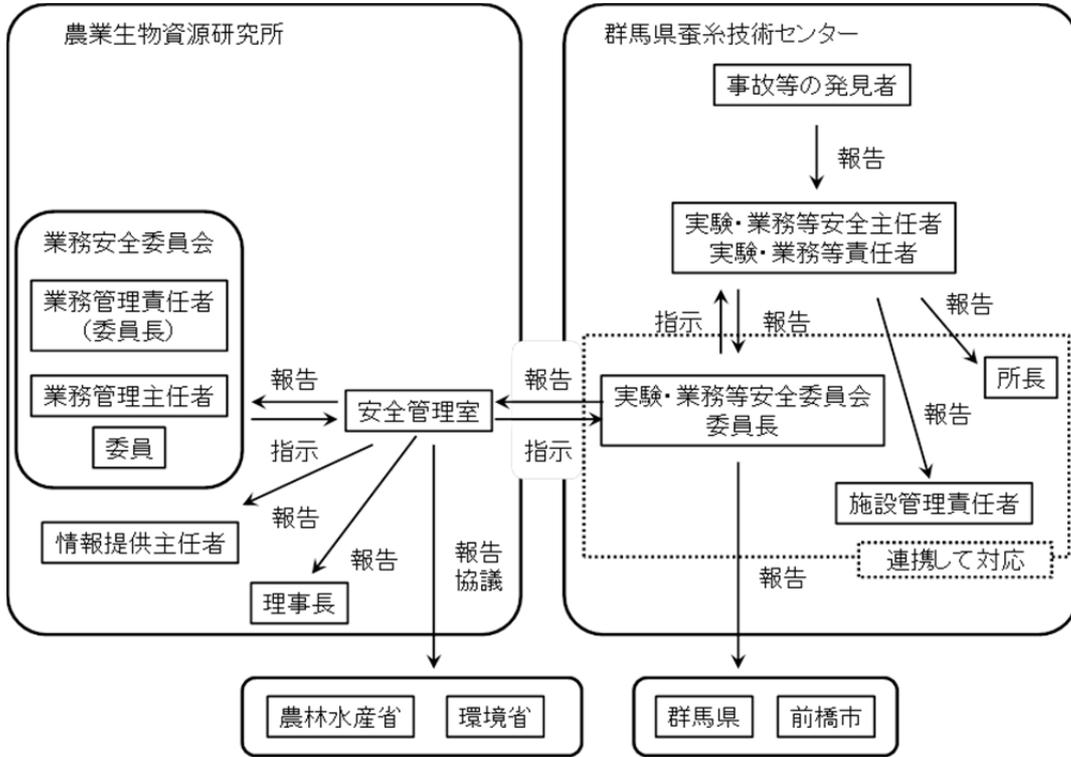
##### 委員

【個人情報につき非開示】 群馬県蚕糸技術センター 次長  
【個人情報につき非開示】 群馬県蚕糸技術センター 蚕糸研究係  
【個人情報につき非開示】 群馬県蚕糸技術センター 技術支援係  
【個人情報につき非開示】 前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合  
【個人情報につき非開示】 前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合

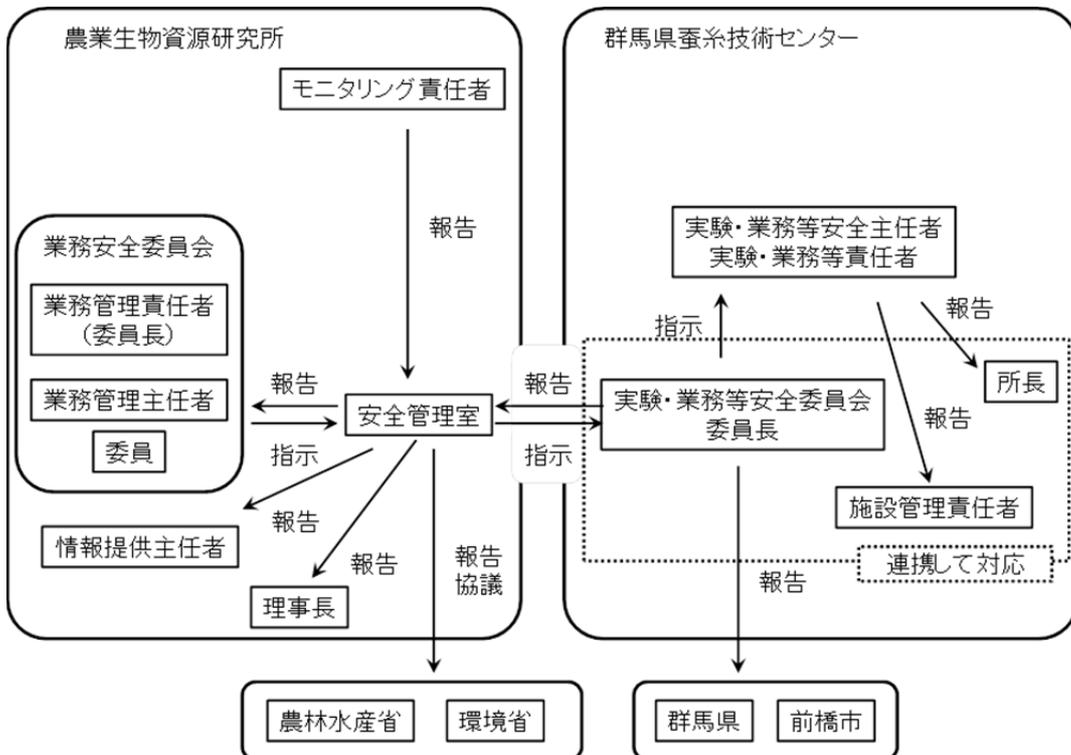
資料3. 緊急措置計画書

緊急連絡体制

本遺伝子組換えカイコとクワコとの交雑個体が群馬県蚕糸技術センターにおいて観察された場合及び気象災害等が発生した場合の緊急連絡体制は以下のとおりとする。



国立研究開発法人農業生物資源研究所における遺伝子解析により本遺伝子組換えカイコとクワコとの交雑個体が検出された場合の緊急連絡体制は以下のとおりとする。



## 資料4. 審査データの概要

審査に使用した評価のデータ。

### 1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

#### (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

##### イ 和名、英名及び学名

和名：カイコ

英名：silkworm

学名：*Bombyx mori* (Linnaeus)

##### ロ 宿主の品種名又は系統名

###### ① 中 514 号

遺伝子組換えカイコの作出に際して、最初に卵にプラスミド DNA を注入して遺伝子を導入した系統である。

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所において育成した二化性の中国種系統であり、この中 514 号を②中 515 号と交配した F1 は極細繊維度蚕品種「はくぎん」として用いられている（農林水産省農産園芸局、1998；山本ら、1999）。

###### ② 中 515 号

①の中 514 号から作出した遺伝子組換えカイコ系統と交配して F1 を得るための系統である。

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所において育成した一化性の中国種系統である（農林水産省農産園芸局、1998；山本ら、1999）。

##### ハ 国内及び国外の自然環境における生息状況

カイコの自然環境における生息の報告はない。なお、日本に生息する近縁野生種であるクワコ (*Bombyx mandarina*) の生息状況については別添 1 及び別添 2 を参照。

養蚕農家で飼育するカイコについては、蚕種製造業者において、産卵後のカイコのメス成虫が微胞子虫を保有しているかどうかを調べる母蛾検査が一般的に行われている。その際、感染が判明した場合はそのメス成虫が産んだ卵を廃棄し、微胞子虫の経卵感染を防いでいる。本遺伝子組換えカイコを作出する際に用いた宿主系統である中 514 号と中 515 号についても母蛾検査を実施し、陰性のメス成虫が産んだ卵のみが宿主として用いられた。なお、本遺伝子組換えカイコにつ

## 資料4. 審査データの概要

いても、桑葉を与えて飼育した場合は、採卵のたびに母蛾検査を実施し、陰性のメス成虫が産んだ卵のみを飼育している。

### (2) 使用等の歴史及び現状

#### イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

カイコ (*B. mori*) は、野生のクワコ (*B. mandarina*) を馴化してきわめて高度に家畜化した昆虫であり、その飼育は今から数千年前の中国本土において始まり、日本には弥生時代に養蚕が伝えられたと考えられている (日本蚕糸学会、1992; 森、1995; 河原畑、1998; 図1)。

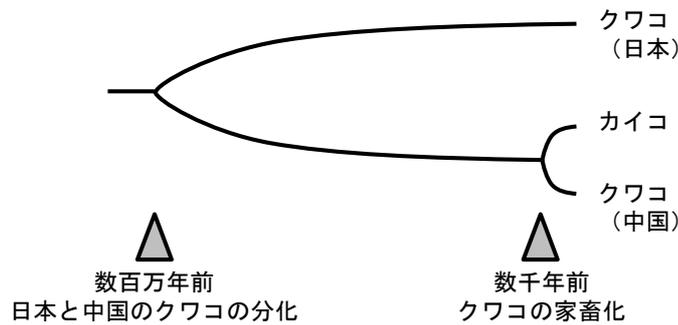


図1. クワコとカイコの系統関係 (模式図)

明治時代以降は重要な輸出品である生糸を生産するため、日本国内において養蚕が盛んになり、最盛期である1930年には収繭量が39.9万トンに達したが、2013年には168トンにまで落ち込んでいる (農林水産省、2009; 蚕糸・絹業提携支援センター、2015; 図2)。

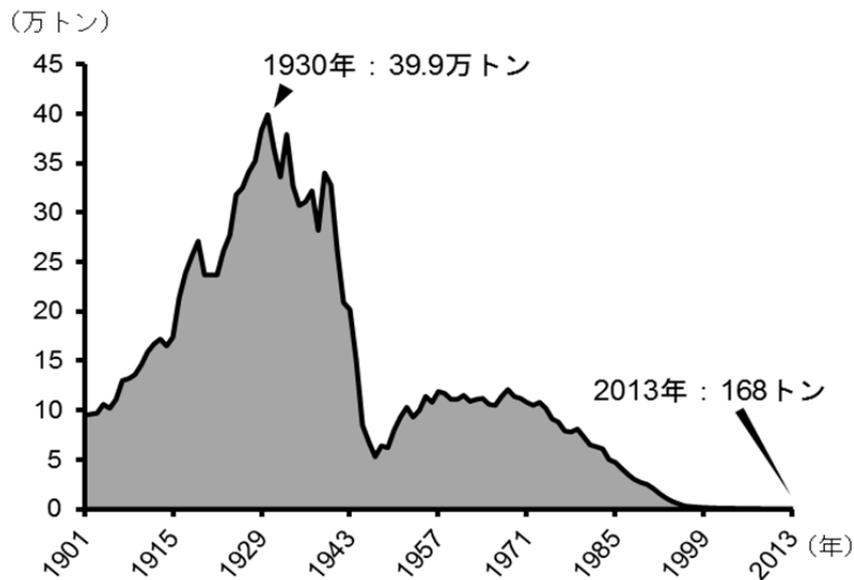


図2. 日本の収繭量の推移

平成20年度蚕業に関する参考統計 (農林水産省、2009) 及びシルクレポート41号 (蚕糸・絹業提携支援センター、2015) に基づいて作成

#### 資料4. 審査データの概要

##### ロ 主たる生産地域、生産方法、流通実態及び用途

カイコは、世界の温帯から熱帯地域で飼育されている。近年の主な生産国は中国、インド、ベトナムなどであり、世界全体の繭生産量 80 万トンのうち 77%が中国（62 万トン）、16%がインド（13 万トン）で生産されている（蚕糸・絹業提携支援センター、2015）。2013 年の日本の繭生産量は 168 トンであり、主な生産地は、福島県を中心とした東北地方と、群馬県を中心とした関東地方である（蚕糸・絹業提携支援センター、2015；図 3）。

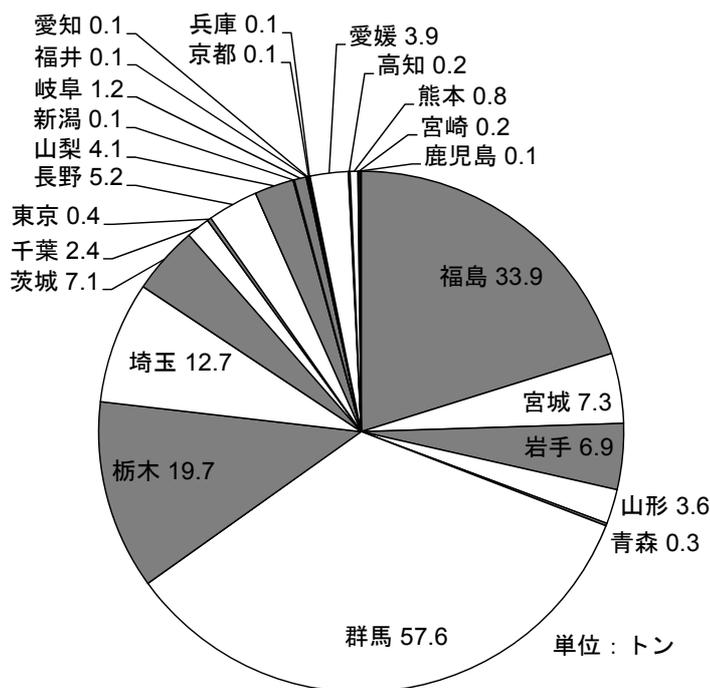


図 3. 都府県別の収繭量（2013 年）

シルクレポート 41 号（蚕糸・絹業提携支援センター、2015）に基づいて作成

養蚕で得られる産物の多くは生糸などの繊維製品として流通している。国内で生産される生糸のほとんどは国内消費向けに流通している。2013 年には、生糸の国内生産量が 409 俵（約 25 トン）であったのに対し、輸入量は 9,332 俵（約 560 トン）であった（蚕糸・絹業提携支援センター、2015）。また、同じ 2013 年には、絹糸の輸入量が 15,844 俵（約 951 トン）であったのに対して輸出量が 426 俵（約 26 トン）、絹織物の輸入量が 6,662 平方メートルであったのに対して輸出量が 5,431 平方メートルであった（蚕糸・絹業提携支援センター、2015）。

近年は、絹糸を繊維製品以外の化粧品等に用いることがあるほか、遺伝子組換えバキュロウイルスを感染させたカイコを工場で飼育してイヌやネコのインターフェロン等の有用物質を生産する用途にも利用されている（植田、2006）。遺伝子組換えカイコの作出技術が実用化される前のカイコを用いた有用物質生産では、飼育のたびにバキュロウイルスを感染させる労力や、遺伝子組換えバキュロウイルスの封じ込めなどの課題がある。

## ハ 国内における養蚕を目的とした飼育の現状

日本国内での飼育期間は桑葉が入手可能な春から秋までで、屋内での飼育が一般的である。

養蚕農家で生糸生産のために飼育する実用品種としては、2種類の原種を交配して得られる二元交雑種や、4種類の原種から2段階の交配を経て得られる四元交雑種などの一代雑種が用いられており、その蚕種（卵）は養蚕農家が自ら作るのではなく、専門の蚕種製造業者が生産し、養蚕農家はこれを購入して飼育している（福田、1979）。蚕種製造業者では、微粒子病を引き起こす微胞子虫（*Nosema bombycis*）の経卵感染を防ぐため、産卵後のカイコのメス成虫が微胞子虫を保有しているかどうかを調べる母蛾検査が一般的に行われ、感染が判明した場合、卵は廃棄される。

現在、日本国内の多くの養蚕農家では、孵化から3回目の脱皮直前までの期間（10日間程度）は、温度・湿度が管理され、清潔な飼育環境を維持できる稚蚕共同飼育所で共同飼育を行っており、その間は人工飼料を用いることが多い。各養蚕農家では3回目の脱皮直前でカイコを受け取って4齢から桑葉での飼育を開始し、12～13日間程度で5齢幼虫が吐糸を開始する。吐糸開始から10日間程度で繭の段階で、品種ごとに区別して袋に入れ、製糸工場等に出荷する。繭を放置すると、吐糸開始から2～3週間程度で成虫が羽化するが、繭から成虫が出ると、その繭が製糸に使えないだけでなく、成虫の排泄物により他の繭も汚染されて商品価値がなくなるため、養蚕農家で成虫を生じさせることはなく、製糸工場でもただちに熱風等により繭を乾燥させ、内部の蛹を殺し、成虫が生じることはない。また、養蚕農家では一代雑種を購入して飼育するため、採卵も行われぬ（図4）。

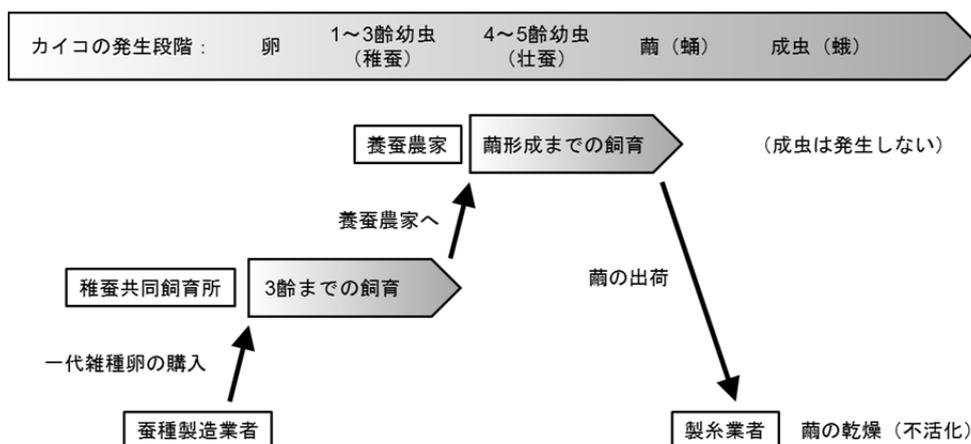


図4. 一般的な養蚕の流れ

年間の飼育回数や飼育時期は、気候や各養蚕農家の事情等によって異なるが、たとえば、群馬県においては5月上旬から9月下旬まで、年間4回の飼育を行う場合が多い（図5）。群馬県下仁田町でのクワコ成虫の発生時期と比較すると、各飼育期（蚕期）の終わりに繭を回収する時期とクワコ成虫の発生が重なる場合と重ならない場合がある（図5）。

## 資料4. 審査データの概要

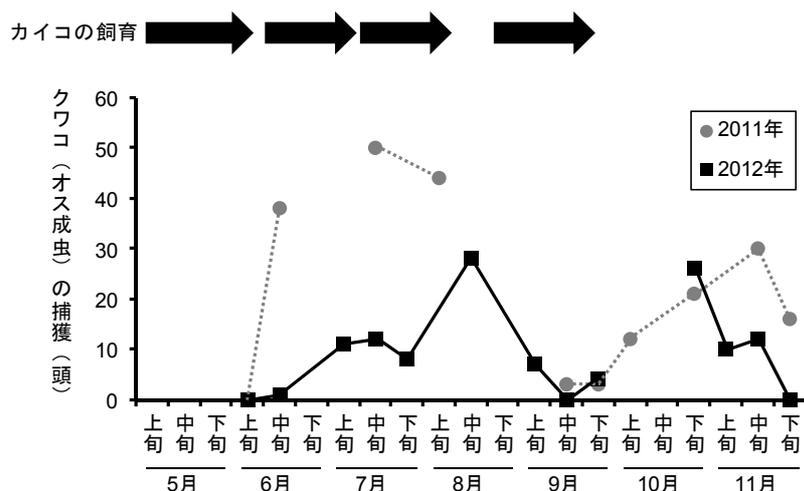


図5. 群馬県でのカイコの飼育時期とクワコ成虫の発生時期との比較（別添3参照）

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

カイコの卵は長径 1.3 mm、短径 1 mm、厚さ 0.5 mm くらいの平たい楕円形で、外側は固い卵殻で包まれている（森、1995）。自然状態で 1 年に 1 回しか世代を繰り返さず卵休眠する 1 化性系統と、2 回世代を繰り返す 2 化性系統、休眠しないで世代を繰り返す多化性系統がある（日本蚕糸学会、1992）。1 化性系統や 2 化性系統は飼育条件や卵の保護温度の管理、浸酸（卵の塩酸浸漬）などによって、孵化時期を人為的に制御可能である。

通常 4 回の幼虫脱皮を経て、孵化後 25 日間程度で営繭する。その後、繭の中で蛹を経て 2～3 週間程度で成虫になる（森、1995）。遺伝的な要因や飼育条件等の影響によっては、通常より 1 回少ない 3 回の幼虫脱皮の後に蛹になる場合もあり、このようなカイコを三眠蚕と呼ぶ（脱皮前の静止状態を「眠」と言い、3 回目の脱皮の後の 4 齢が最終齢となってその後蛹になることから）。三眠蚕の 4 齢期（最後の幼虫期間）は通常のカイコの 4 齢期よりも数日長く（竹内、1954）、通常のカイコが 4 回目の脱皮のために静止している期間に、三眠蚕は桑葉を摂食するために体を動かすため、容易に発見でき直ちに排除される。現在では、実用系統を養蚕農家等で飼育する場合には、3 齢まで温度や湿度が管理された施設で人工飼料を与えて育てることで性質を安定させており、三眠蚕が生じることはきわめて稀である。

繭の形は系統により様々で、楕円型・俵型・破風型などがあるほか、2 頭以上が 1 つの繭を作る玉繭もある。繭の色は白色が多いが、系統によって黄色・肉色・薄緑色などがある。

カイコは数千年前に中国で野生のクワコを馴化して家畜化されたと考えられており、現在は運動性が極めて退化している。たとえば、幼虫は餌がなくなっても飼育容器から外に出ることがな

#### 資料4. 審査データの概要

いため、養蚕農家では飼育容器に蓋をすることなく飼育している。また、成虫に翅はあるが、体が大きいことや飛翔筋が弱いため、羽ばたくことはできても飛ぶことは全くできない。オス成虫はメス成虫の放出する性フェロモンを感知すると飛ばずに歩いて探索する。交尾後のメス成虫も飛ばずに歩きながら産卵する。メス成虫が産卵する範囲を調べたところ、半径 18 cm 以内に 85% の卵を産んでいた（河本ら、2014）。実用品種においては繭が厚くなりすぎているため羽化した成虫が繭から出てこられない場合も多い。カイコはクワコのような擬態行動をすることがなく、体色も白色のものがほとんどで保護色がなく、自然環境下で鳥などの捕食者から身を守る能力を失っている。成虫の生存期間は、最も長い系統で 15 日間との報告がある（村上ら、2010）。

なお、クワコの基本的特性については別添 1 を参照。

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

幼虫は桑葉のみを摂食して成長し、成虫は一切の摂食・飲水を行わない（日本蚕糸学会、1992）。

カイコの生存可能な温度範囲は発育時期によって異なるが、おおむね 7~40℃であり、実用的に飼育できるのは 20~30℃である（福田、1979）。湿度は、高すぎると病原微生物が発生しやすくなり、低すぎると桑葉が萎れやすくなる。また、1 齢では多湿が望ましく、5 齢ではある程度の乾燥環境がよいが、いずれにしても、90%以上や 50%以下の湿度は生育に不適當である（福田、1979）。飼育の光条件は生育の揃いに影響し、明で 16 時間、暗で 8 時間程度にするのがよい（福田、1979）。

カイコは基本的に屋内で容器に入れて飼育されている。飼育容器は、飼育の目的や規模によって異なる。多くの養蚕農家では、長さ数 m 以上、深さ数十 cm の容器を用いて、枝に付いたままの葉（条桑）を与えて大量飼育を行っている（図 6）。養蚕農家で壮蚕（4~5 齢期）を飼育する場合、湿度過多を避けるため、飼育容器には蓋をすることはない。養蚕農家での 1 回の飼育数は 10 万頭程度が平均的だが、大規模な養蚕農家では 1 回に 30 万頭程度を飼育する例もある。飼育に伴って生じる枝や糞等の飼育残渣の量は、飼育規模や季節等によっても変動するが、12,000 頭を飼育した場合、400 kg 程度が生じる。



図 6. 条桑によるカイコの大量飼育用の容器の例

#### 資料4. 審査データの概要

カイコ幼虫の運動性は極めて低く、餌（桑葉）がなくなっても逃亡せず、蓋のない容器でも飼育できる。たとえば、小泉・松田（1960）は、ほぼ平らな竹製の蚕箔（ざるの様な飼育台）に蚕座紙を敷いた飼育条件で幼虫の行動範囲を調べているが、蚕箔内の調査範囲の外に幼虫が出ることはなかった。また、脚の把握力が弱いため、仮に屋外の桑樹に幼虫を置いても、風等により容易に落下する。

幼虫期の最後に繭を形成する前（熟蚕期）には摂食を停止して行動が活発になり、上方への移動を開始するが、容器の角など繭を作ることができる足場に到達すると、そこで移動をやめて繭を形成する。養蚕農家では、繭1個分に区切られた簇（まぶし）を多数連結した回転簇に幼虫を登らせて繭を作らせる方法が一般的である（図7）。

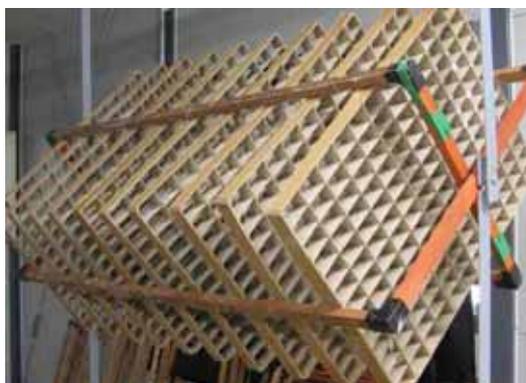


図7. 回転簇の例

上簇中のカイコ幼虫が上方に移動すると、その重みで簇が回転する。これが繰り返されることにより、カイコが全体に均等に分布し、1区画に1頭ずつ繭を作る。

通常、養蚕農家においては繭の段階で出荷するため成虫が生じることはない。また、飼育するカイコのほとんどは複数の系統を交配して作る一代雑種であり、一般の養蚕農家が自ら採種（卵製造）することはないため、養蚕農家で成虫を生じさせることはない。農家から出荷された繭は、品質を維持して長期保存するために製糸工場等で乾繭（熱風等で繭を乾燥させること）されるため、繭中の蛹は成虫になる前にすべて死ぬこととなる。成虫は翅はあるが、飛翔筋が弱く体が大型化していること等により全く飛ぶことができず、胸脚を用いて歩行することで移動する。

カイコの幼虫は、人間の管理が行き届かない野外に放置されると、歩き回ることがないため、食草であるクワに到達することができない。また、野生種であるクワコの幼虫とは異なり、擬態のための体色や斑紋を欠いており、桑樹に登って隠れることもできず、頭部・胸部を持ち上げて静止することで枝に擬態する行動も執らないことなどから、鳥や昆虫に速やかに捕食される（別添4）。野外でオス成虫が生じて、飛ぶことが全くできないため、離れた場所にいるメス成虫に到達することができず、メス成虫が生じて速やかにアリ等に捕食されること等のため、交尾・産卵する機会がほとんどない（別添4）。

なお、クワコの生息又は生育可能な環境の条件については別添1を参照。

## ハ 捕食性又は寄生性

該当なし。

## ニ 繁殖又は増殖の様式

カイコは受精によって生じた卵から発生する有性生殖を行う。

蛹からの羽化（成虫の発生）は午前中に起きる（普後、1982）。蚕種製造や育種のためにカイコを交配して卵を得る際は、羽化した雌雄成虫を午前中のうちに交尾させ、午後から翌朝にかけて産卵させる。

メス成虫は静止したまま、尾部のフェロモン腺から性フェロモン（ボンビコール）を大気中に放出してオス成虫を誘引する。成虫は雌雄ともに飛ぶことがまったくできないため、性フェロモンを感知したオス成虫は歩いてメス成虫を探す。羽化した雌雄成虫を一緒に容器に入れておくと、オス成虫はただちに性フェロモンを感知してメス成虫に接近して交尾を開始する。交尾が成立したペアには個別に覆いをかぶせてペアを維持しておく場合もある。

交尾を数時間させた後は、人為的に割愛（雌雄を分けること）し、産卵用の紙の上にメス成虫を置いて産卵を開始させる。産卵は割愛後すぐに始まる場合もあるが、多くの場合では、周囲が暗くなる夕方以降に最盛となる（小泉ら、1962；高見、1969）。割愛後のメス成虫は産卵用の紙の上を歩きながらその紙に卵を付着させて産卵する。メス成虫1頭の産卵数はおおよそ500個前後である（森、1995）。なお、通常の養蚕農家での繭生産においては出荷先の製糸工場等で繭を乾燥させて蛹を殺すため、成虫は現れない。

卵の休眠性は、自然状態で1年に1回しか世代を繰り返さず卵休眠する1化性系統、2回世代を繰り返す2化性系統及び休眠しないで世代を繰り返す多化性系統がある（日本蚕糸学会、1992）。現在、繭生産のために飼育されるのは1化性系統又は2化性系統である。1化性系統や2化性系統は飼育条件や卵の保護温度の管理、浸酸などによって、孵化時期を人為的に制御可能である。一定期間以上冷蔵保存した休眠卵を25℃で保温すると、10～14日間程度で孵化する。非休眠卵は産下後10～14日間程度で孵化する。

ごく稀ではあるが単為発生が起きることがあり、未交尾のメス成虫が産卵した不受精卵を放置した調査で、10月に羽化したメス成虫約150頭が産卵した約49,800個の不受精卵を自然のまま放置したところ翌春に132頭（0.27%）が孵化した例や、6月に羽化したメス成虫621頭が産卵した約120,000個の不受精卵を自然のまま放置したところ翌年に22頭（0.018%）が孵化した例が報告されている（川口、1934）。

カイコはきわめて高度に家畜化された昆虫であり、幼虫は餌がなくなってもほとんど移動せず、成虫は飛ぶことができないなど、移動能力が極めて低い。上蔟時に繭を形成する場所を探して移動するが、飼育容器の角など営繭に適した場所があれば、その場にとどまる。このため、野外に

#### 資料4. 審査データの概要

逃亡することはなく、野外で生存又は繁殖できない（別添4、別添5）。

養蚕農家で生糸生産のために飼育する実用品種としては、2種類の原種を交配して得られる二元交雑種や、4種類の原種から2段階の交配を経て得られる四元交雑種などの一代雑種が用いられており、その蚕種（卵）は養蚕農家が自ら作るのではなく、専門の蚕種製造業者が生産し、養蚕農家はこれを購入して飼育している（福田、1979）。

なお、他の昆虫ではウォルバキア等の共生細菌の感染により、細胞質不和合性が生じて繁殖できなくなる場合があることが報告されているが、カイコにおいてはそのような報告はない。

クワコの繁殖又は増殖の様式については別添1を参照。

##### 【カイコとクワコとの間の交雑の可能性】

クワコとカイコの交雑個体が野外で発見されたという報告はないが、カイコとクワコは人為的に交雑させることができ、得られた交雑個体及びその後代には妊性がある。たとえば、室内での飼育においては、F3やF4まで経代飼育した結果が報告されている（児玉、1927; 見波・大場、1939）。また、F1の幼虫を屋外の網室の桑樹に放置し、鳥やハチから捕食されずクワコ等の野生の昆虫との競合もない条件で管理したところ、その後、成虫の発生が確認され、翌年以降も幼虫や成虫の発生が観察された（別添8）。

カイコとクワコはメス成虫が同じ性フェロモンを放出してオス成虫を誘引し、交尾する（Kuwahara *et al.*, 1984）。カイコとクワコの間での生殖隔離、すなわち交雑可能性の程度を探るために、ざる籠内にカイコとクワコの成虫を入れて交尾させた調査では、少しでも受精卵が得られたペアの割合は、カイコ（メス）×カイコ（オス）では100%（10ペアすべて）、クワコ（メス）×クワコ（オス）では89%（47ペア中42ペア）、カイコ（メス）×クワコ（オス）では21%（18ペア中2ペア）となり、クワコ（メス）×カイコ（オス）の組み合わせでは交尾が成立しなかった（中村ら、1997）。同様にざる籠内での交尾について調査した別の報告では、カイコ（メス）×カイコ（オス）では100%（20ペアすべて）、クワコ（メス）×クワコ（オス）では85%（20ペア中17ペア）、カイコ（メス）×クワコ（オス）では45%（20ペア中9ペア）、クワコ（メス）×カイコ（オス）では0%（20ペア中0ペア）であった（飯塚・行弘、2007）。カイコのオス成虫は飛ぶことが全くできない（森、1995）ことから、クワコのメス成虫が羽化した樹上で性フェロモンを放出しながら静止しているところに到達することはできない。また、クワコのメス成虫とカイコのオス成虫をざる籠内に入れた際の行動を観察すると、クワコのメス成虫が歩行力・飛翔力ともにカイコのオス成虫より活発であるために、カイコのオス成虫が交尾のために接近するとクワコのメス成虫が動き回って交尾が成立しないことが報告されている（中村ら、1997）。

なお、北海道から鹿児島までの日本各地で採集したクワコと、カイコの様々な系統とについて、ミトコンドリアゲノムのCO1(cytochrome c oxidase subunit 1)遺伝子（クワコ4,192個体とカイコ147系統）の遺伝的多型を解析したところ、野生のクワコにカイコのミトコンドリアゲノムが流入した痕跡は認められていない（Yukhiro *et al.* 2012, 別添6）。

## 資料4. 審査データの概要

また、飼育残渣を桑畑の中や隣接地に廃棄するなど、特段の交雑防止措置を講じない慣行的な手法でカイコ幼虫を飼育している養蚕農家の周辺で採集したクワコについて CO1 遺伝子の遺伝的多型を解析したところ、2,939 個体すべてがクワコ型であり、交雑第一代は発見されなかった（別添 7）。

### ホ 病原性

該当なし。

### ヘ 有害物質の産生性

該当なし。

### ト その他の情報

#### 【宿主として用いた系統の脱皮・変態・休眠等の性質】

本申請に係る遺伝子組換えカイコを作出するにあたって使用した系統である中 514 号及び中 515 号は、通常の蚕品種と同様、4 回の幼虫脱皮の後、5 齢を最終齢として、蛹を経て成虫になり、休眠卵を産む。

#### 【寄生バエやハチ、ネズミ等の野生生物から捕食される可能性】

養蚕農家においてカイコに被害を与える主な動物としては、寄生性のカイコノウジバエ (*Blepharipa zebina*)、クワコヤドリバエ (*Exorista sorbillans*)、カイコノシラミダニ (*Pediculoides ventricosus*) がある（日本蚕糸学会、1992）。その他にも、ブランコヤドリバエ (*Exorista japonica*) による寄生や、ハサミムシ類、カマドウマ類、ウマオイ類、ハネカクシ類、ゴミムシ類、アシナガバチ類、アリ類による捕食も報告されている（横山、1929）。

## 2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### 遺伝子導入法の全体像

本遺伝子組換えカイコの作出には、転移因子（トランスポゾン）の一つである *piggyBac* による遺伝子導入法を用いた。*piggyBac* は、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*、昆虫綱：チョウ目) の培養細胞 TN-368 に由来する転移因子であり、DNA 上で切り出されたり挿入されたりする性質を利用して、様々な昆虫種で遺伝子導入に用いられている（Cary *et al.*, 1989; Handler, 2002）。*piggyBac* は、転移酵素遺伝子が 2 つの末端配列に挟まれた構造を持っている。*piggyBac* の転移酵素を発現させると、この転移酵素が末端配列に特異的に結合して切断し、切り出された *piggyBac* が宿主ゲノム中にランダムに挿入される（図 8）。ただし、このままでは *piggyBac* 自体から発現する転移酵素の働きによって、ゲノム中の他の場所に転移したり失われたりする可能性があるため、*piggyBac* を改変した遺伝子導入系が必要となる。

#### 資料4. 審査データの概要

そこで、カイコに安定的に遺伝子を導入するために、*piggyBac* を改変した2種類のプラスミドを組み合わせ用いた(図9)。一つは、転移酵素遺伝子の代わりに、導入したい目的遺伝子を挿入したドナープラスミドで、もう一つは、*piggyBac* の末端配列のうちの1つを欠損させたヘルパープラスミドである。転移酵素を供給するヘルパープラスミドは、片方の末端配列が欠損しているため、それ自体はカイコゲノム中に挿入されず、同時に導入したドナープラスミド中の末端配列に挟まれた領域を切り出してカイコゲノム中に挿入させることができる。

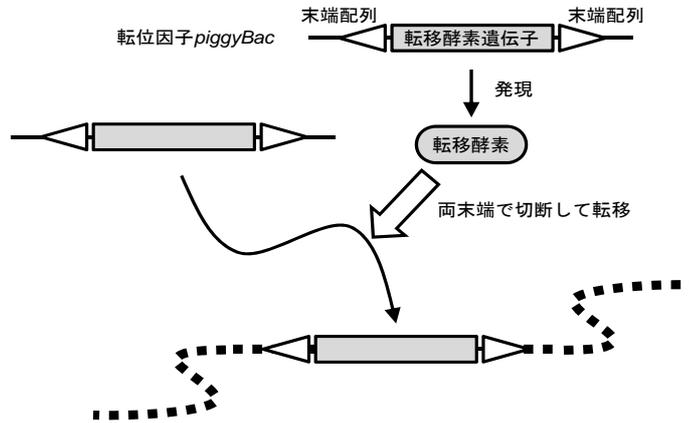


図8. 転移因子 *piggyBac* の働き

ドナープラスミドとヘルパープラスミドをカイコに導入するため、2つのプラスミドを混ぜてカイコ受精卵に顕微注入した。これにより、ヘルパープラスミドから供給された転移酵素の働きで、目的遺伝子がカイコゲノム中に挿入される。顕微注入した個体の中では一部の細胞だけがこの目的遺伝子を持つこととなり、もし、卵や精子になる生殖細胞系列でこの挿入が起きると、注入した次の世代の中に、遺伝子組換え個体が生じる。一方、ヘルパープラスミド自体はカイコ細胞中では増幅しないので、発生が進んで細胞数が増えるにしたがって、細胞1つあたりに含まれる分子の数が減少したり分解されたりして、最終的には失われる。その結果、安定的に目的遺伝子を持つ遺伝子組換えカイコを作出することができる。

資料4. 審査データの概要

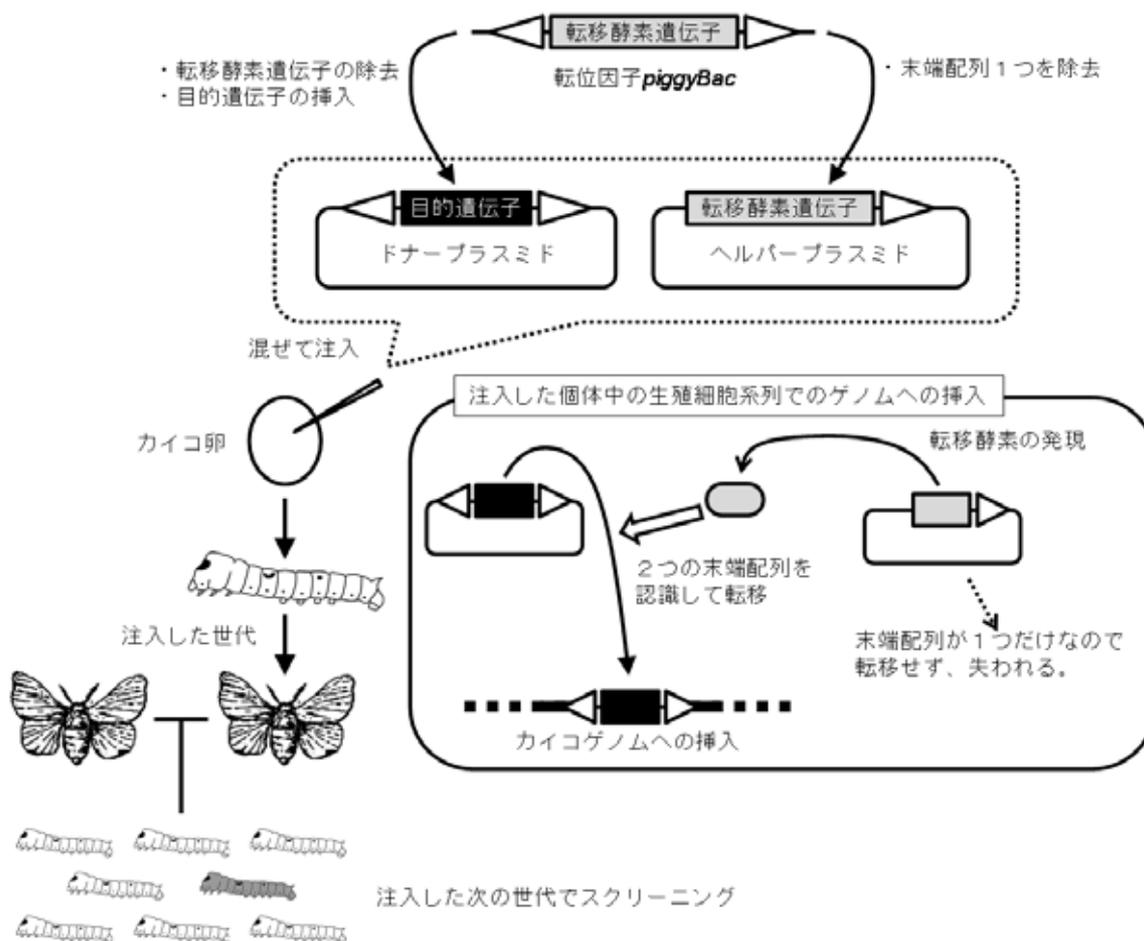


図9. 遺伝子組換えカイコの作出法

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

【ドナープラスミド】

本遺伝子組換えカイコの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表1に示した。また、構成の模式図を図10に、目的遺伝子の塩基配列を別添10に示した。

表1 供与核酸のサイズと、由来、機能

構成要素	サイズ (kb)	由来及び機能
改変フィブロインH鎖遺伝子発現カセット (改変 <i>Fibroin H</i> 遺伝子発現カセット)		
<i>Fibroin H</i> promoter (フィブロイン H 鎖遺伝子プロモーター)	5.0	カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のプロモーター。フィブロイン H 鎖遺伝子が発現する後部絹糸腺での遺伝子の転写を規定する (Kojima <i>et al.</i> , 2007)。
改変 <i>Fibroin H</i> (目的遺伝子)	1.8	カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のうち、グリシン-ア

資料4. 審査データの概要

である改変フィブロインH鎖遺伝子)		ラニンを主とする繰返し配列をコードする領域のほぼすべてを、グリシンおよびグルタミン酸を主に含むアミノ酸配列をコードする合成遺伝子に置換したもの (別添 10)。生糸の染色性を高める (別添 19)。
<i>Fibroin H polyA</i> (フィブロイン H 鎖遺伝子ターミネーター)	0.8	カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のターミネーター。転写終結を規定する (Kojima <i>et al.</i> , 2007)。
緑色蛍光タンパク質遺伝子 (マーカー遺伝子) 発現カセット (アクセッション番号 AB779767 の一部)		
3xP3 promoter	0.2	眼での遺伝子発現のために人工的に合成された塩基配列である 3xP3 を、キイロショウジョウバエ ( <i>Drosophila melanogaster</i> ) 由来熱ショックタンパク質 <i>hsp70</i> 遺伝子のプロモーターに結合させたプロモーター。遺伝子の眼での転写を規定する (Berghammer <i>et al.</i> , 1999; Thomas <i>et al.</i> , 2002)。
<i>EGFP</i> (改変緑色蛍光タンパク質遺伝子)	0.7	オワンクラゲ ( <i>Aequorea victoria</i> ) 由来の改変緑色蛍光タンパク質遺伝子 (クロンテック社; Yang <i>et al.</i> , 1996)。遺伝子組換えカイコを選抜するためのマーカー遺伝子として用いる。上流に接続した 3xP3 promoter の働きと合わせて、遺伝子組換えカイコの眼で <i>EGFP</i> を発現する。
SV40 polyA (SV40 ターミネーター)	0.3	シミアンウイルス 40 (Simian virus 40) ゲノム由来のターミネーター。転写終結を規定する。
その他 (アクセッション番号 AB713995 の一部)		
<i>piggyBac R</i>	1.1	イラクサギンウワバ ( <i>Trichoplusia ni</i> ) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の末端配列 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。カイコゲノムへの挿入に際して、 <i>piggyBac</i> 転移酵素の認識配列として働く。
<i>piggyBac L</i>	0.7	イラクサギンウワバ ( <i>T. ni</i> ) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の末端配列 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。カイコゲノムへの挿入に際して、 <i>piggyBac</i> 転移酵素の認識配列として働く。
外骨格領域 (本遺伝子組換えカイコゲノム中には存在しない)		
pUC ori	0.7	大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 由来のプラスミド ColE1 の複製開始点。本プラスミドを大腸菌中で増幅するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。
<i>AmpR</i>	0.9	抗生物質アンピシリンに対する耐性遺伝子。本プラスミドを持つ大腸菌を選抜するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。

資料4. 審査データの概要

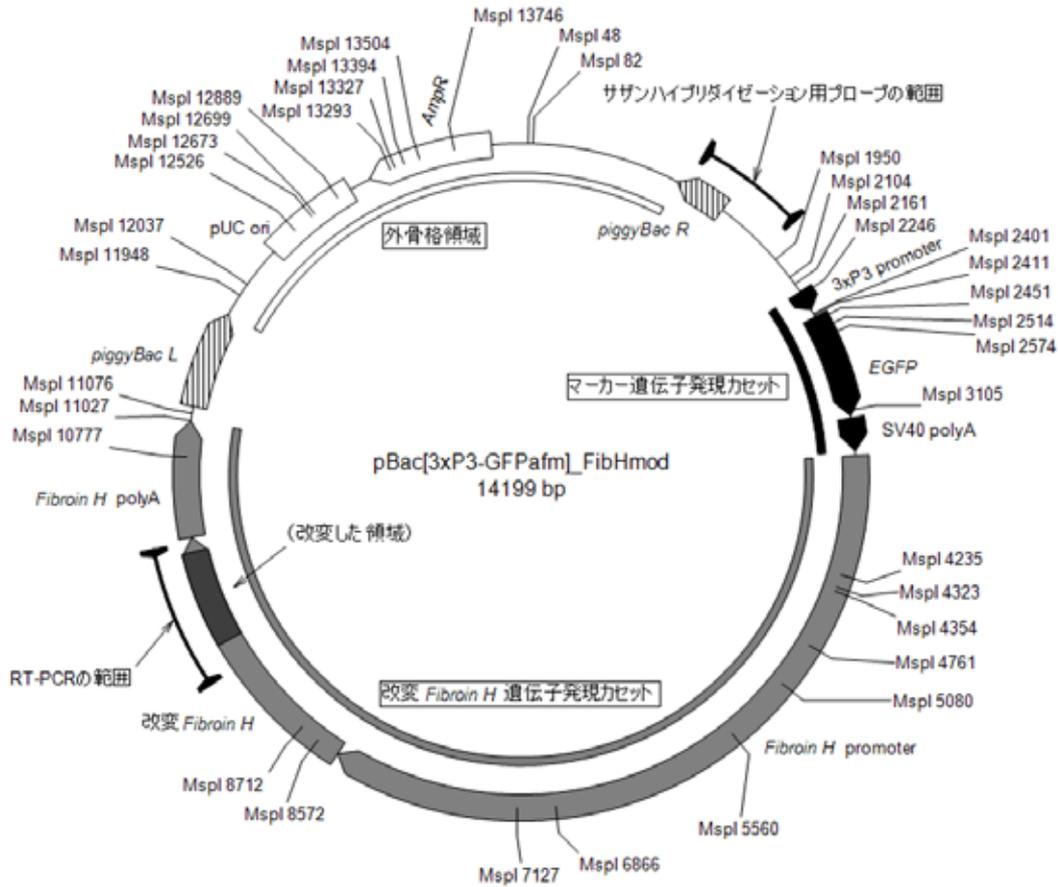


図 10. 改変 Fibroin H 遺伝子導入に用いたプラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod の構造

*piggyBac R* : *piggyBac* 転移酵素認識部位を含む *piggyBac* 末端配列

緑色蛍光タンパク質遺伝子（マーカー遺伝子）発現カセット

*3xP3 promoter* : *3xP3* プロモーター。眼での転写を規定。

*EGFP* : 改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子。選抜マーカーとして利用。

*SV40 polyA* : シミアンウイルス 40 ゲノム由来のターミネーター。転写終結を規定。

改変フィブロイン H 鎖遺伝子発現カセット（改変 *Fibroin H* 遺伝子発現カセット）

*Fibroin H promoter* : フィブロイン H 鎖遺伝子のプロモーター。

後部絹糸腺での転写を規定。

改変 *Fibroin H* : フィブロイン H 鎖遺伝子の一部の塩基配列を改変したもの。

目的遺伝子。

*Fibroin H polyA* : フィブロイン H 鎖遺伝子のターミネーター。転写終結を規定。

*piggyBac L* : *piggyBac* 転移酵素認識部位を含む *piggyBac* 末端配列

外骨格領域（カイコゲノム中には挿入されない。）

*pUC ori* : 大腸菌で機能する複製開始領域。

*AmpR* : アンピシリン耐性遺伝子。

RT-PCR の範囲 : 遺伝子発現の安定性を確認するための RT-PCR の範囲

当該構成を得るまでにとられた過程を図 11 に示す。まず、転移因子 *piggyBac* を pUC18 に挿入して得られた p3E1.2 (Cary *et al*, 1989) に、緑色蛍光タンパク質発現カセット (3xP3-EGFP) を挿入す

#### 資料4. 審査データの概要

るとともに、*piggyBac* 転移酵素遺伝子の一部を除去して pBac[3xP3-EGFPafm] を作製した (Horn and Wimmer, 2000)。これに、改変フィブロイン H 鎖遺伝子発現カセット (改変 *Fibroin H* 遺伝子発現カセット) を挿入して pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod を作製した。

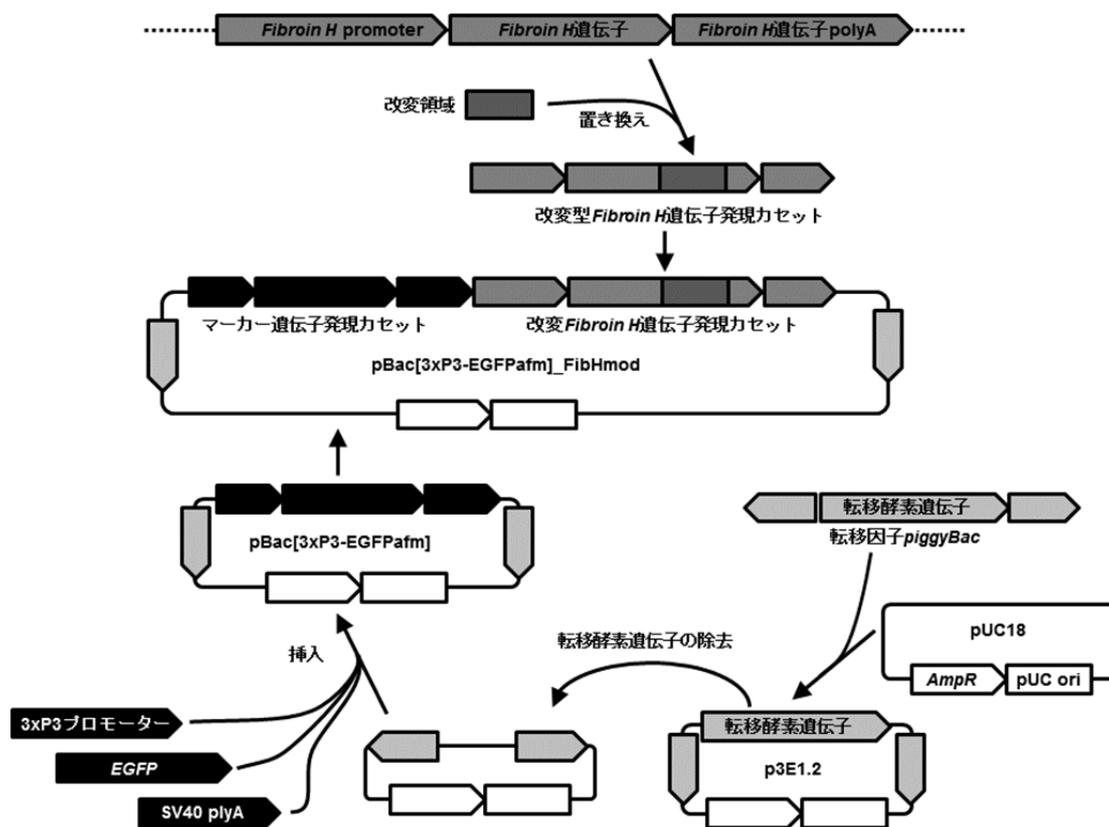


図 11. 改変 *Fibroin H* 遺伝子の導入に用いたプラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod の作製方法

#### 【ヘルパープラスミド】

ドナープラスミドの *piggyBac R* と *piggyBac L* には含まれた目的領域をカイコゲノム中に挿入するためには、転移酵素の働きが必要となる (図 9)。この転移酵素を供給するために、ヘルパープラスミド pHA3PIG を作製して、ドナープラスミドと混ぜてカイコ卵に注入した。このヘルパープラスミド pHA3PIG の構成及び構成要素の由来を表 2 に示した。また、構成の模式図を図 12 に示した (Tamura *et al.*, 2000)。

資料4. 審査データの概要

表2 ヘルパープラスミド pHA3PIG の構成要素と、由来、機能

構成要素	サイズ (kb)	由来及び機能
A3 promoter (細胞質アクチン遺伝子プロモーター)	0.7	カイコ由来の細胞質アクチン A3 遺伝子のプロモーター。様々な組織で遺伝子を発現させることができる (Mounier and Prudhomme, 1991)。
<i>piggyBac</i> transposase ( <i>piggyBac</i> 転移酵素遺伝子)	1.8	イラクサギンウワバ ( <i>T. ni</i> ) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の転移酵素 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。 <i>piggyBac</i> の2つの末端配列の間に挟まれた領域を切り出して、他の DNA 中に挿入する機能を持つ。
<i>piggyBac R</i>	1.1	イラクサギンウワバ ( <i>T. ni</i> ) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の末端配列 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。カイコゲノムへの挿入に際して、 <i>piggyBac</i> 転移酵素の認識配列として働く。
<i>AmpR</i>	0.9	抗生物質アンピシリンに対する耐性遺伝子。本プラスミドを持つ大腸菌を選抜するための配列であり、本遺伝子組換えカイコゲノム中には挿入されない。
pUC ori	0.7	大腸菌 ( <i>E. coli</i> ) 由来のプラスミド ColE1 の複製開始点。本プラスミドを大腸菌中で増幅するための配列であり、本遺伝子組換えカイコゲノム中には挿入されない。

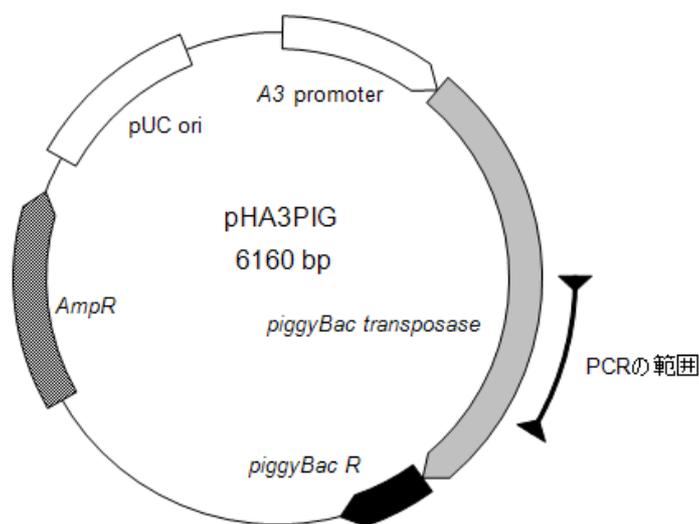


図12. ヘルパープラスミド pHA3PIG の構造

- A3 promoter : カイコ由来細胞質アクチン A3 遺伝子プロモーター。様々な組織での転写を規定。
- piggyBac* transposase : *piggyBac* 転移酵素遺伝子
- piggyBac R* : *piggyBac* 転移酵素認識部位を含む *piggyBac* 末端配列
- pUC ori : 大腸菌で機能する複製開始領域
- AmpR* : アンピシリン耐性遺伝子
- PCR の範囲 : ヘルパープラスミドの残存性を確認するための PCR の範囲

## ロ 構成要素の機能

## ① 供与核酸の構成要素の機能

【ドナープラスミド】

改変フィブロイン H 鎖遺伝子発現カセット

目的遺伝子である改変 *Fibroin H* 遺伝子は、生糸の染色性を高めることを目的として、カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のうち、グリシン - アラニンを中心とする繰返し配列をコードする領域のほぼすべてを、グリシンおよびグルタミン酸を主に含むアミノ酸配列をコードする合成遺伝子に置換している（別添 10、19）。改変 *Fibroin H* 遺伝子を発現する遺伝子組換えカイコから得られた生糸では染色性が高まっていることが確認できたほか、繭糸繊度が細くなった（別添 19）。

フィブロイン H 鎖は、絹糸を構成する主要な繊維タンパク質である。今回移入する遺伝子には、フィブロイン H 鎖遺伝子の発現を調節する上流領域から、mRNA への転写を停止させるターミネーターを含む下流領域までの全体を用いている（Takiya *et al.*, 1990; Kojima *et al.*, 2007）。

フィブロイン H 鎖に挿入したアミノ酸配列が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうか、アレルゲンデータベース（Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)、ver. 13、<http://www.allergenonline.org/>）に対して E 値の閾値を 0.1 として FASTA 検索を行ったところ、既知アレルゲンと 8 アミノ酸残基連続で一致する配列は認められなかった。

この発現カセットは、宿主の持つ代謝系を変化させる機能は有していない。

緑色蛍光タンパク質遺伝子（マーカー遺伝子）発現カセット

本遺伝子組換えカイコの選抜には、緑色蛍光タンパク質 EGFP の眼での発現を利用した。

マーカーである EGFP タンパク質（クロンテック社）は、オワンクラゲ（*Aequorea victori*、刺胞動物門・ヒドロ虫綱）由来の緑色蛍光タンパク質であり、遺伝子発現マーカーとして幅広く用いられている。

3xP3 プロモーターは、眼での遺伝子発現のために人工的に合成された塩基配列である 3xP3 に、キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）由来の熱ショックタンパク質 *hsp70* 遺伝子のプロモーターを結合して作られた。この 3xP3 プロモーターは様々な昆虫の単眼や複眼において遺伝子を発現させる（Sheng *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2002）。なお、3xP3 プロモーターの活性には熱ショックによる誘導は不要である。

SV40 ターミネーターは、シミアンウイルス 40 ゲノム由来のターミネーターで、mRNA への転写を停止させる。

EGFP が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうか、アレルゲンデータベース（Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)、ver. 13、<http://www.allergenonline.org/>）に対して E 値の閾値を 0.1 として FASTA 検索を行ったところ、既知アレルゲンと 8 アミノ酸残基連続で一致する配列は認められなかった。

この発現カセットは、宿主の持つ代謝系を変化させる機能は有していない。

## 資料4. 審査データの概要

### 【ヘルパープラスミド】

ヘルパープラスミドの作製にあたっては、2つの末端配列のうちの1つを削除して、カイコ由来の細胞質アクチン A3 遺伝子のプロモーターを挿入した。これにより、カイコの細胞中で *piggyBac* 転移酵素が発現し、同時に注入したドナープラスミドの *piggyBac* 末端配列の間にある目的遺伝子がカイコのゲノム中に挿入される。一方、ヘルパープラスミド自体は末端配列を1つ欠損しているため、カイコのゲノム中に挿入されることがない (図 9)。

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

本遺伝子組換えカイコの作出に用いたベクターは大腸菌 (*E. coli*) 由来の pUC18 である。

転移因子 *piggyBac* を pUC18 に挿入して p3E1.2 を得た (Cary *et al.*, 1989; 図 11)。ドナープラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod は、p3E1.2 に緑色蛍光タンパク質発現カセットと改変 Fibroin H 遺伝子発現カセットを挿入して得た (図 11)。

ドナープラスミドの2つの末端配列及びその内側を含む領域をカイコゲノムに挿入するため、この末端配列を認識してカイコゲノム中に挿入する *piggyBac* 転移酵素を供給するヘルパープラスミド pHA3PIG を用いた (Tamura *et al.*, 2000; 図 12)。pHA3PIG は細胞質アクチン A3 遺伝子プロモーターの働きで *piggyBac* 転移酵素を発現させるが、末端配列の一つを欠損させているため、それ自体はカイコゲノム中には挿入されない。

### ロ 特性

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

pUC18 の塩基数は 2,686 bp。塩基配列はアクセッション番号 L08752 を参照。

pUC18 に転移因子 *piggyBac* を挿入した p3E1.2 の塩基数は 5,958 bp。塩基配列は *piggyBac* Website (<http://piggybac.bio.nd.edu/>) を参照。

ドナープラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod の塩基数は 14,199 bp。目的遺伝子の塩基配列は別添 10 に示した。

ヘルパープラスミド pHA3PIG の塩基数は 6,160 bp。塩基配列は別添 11 に示した。

#### ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

pUC18 には、微生物中でベクターを増殖する際の選抜マーカーとして、アンピシリン耐性を発現する遺伝子が含まれるものの、本遺伝子組換えカイコのゲノム中にこの遺伝子は導入されてい

## 資料4. 審査データの概要

ない。

p3E1.2 には、*piggyBac* 転移酵素遺伝子及びその両側の末端配列からなる転移因子 *piggyBac* の全体が含まれる。

ドナープラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod においては、p3E1.2 から *piggyBac* 転移酵素遺伝子が除去されている。

ヘルパープラスミド pHA3PIG には、カイコの細胞での遺伝子発現を規定する細胞質アクチン A3 遺伝子プロモーターと、その下流に接続された *piggyBac* 転移酵素遺伝子が含まれる (図 12)。作製にあたっては、2 つの末端配列のうちの 1 つを削除して、カイコ由来の細胞質アクチン A3 遺伝子のプロモーターを挿入した。これにより、カイコの細胞中で *piggyBac* 転移酵素が発現し、同時に注入したドナープラスミドの *piggyBac* 末端配列の間にある目的遺伝子がカイコのゲノム中に挿入される。一方、ヘルパープラスミド自体は末端配列を 1 つ欠損しているため、カイコのゲノム中に挿入されることがない (図 13)。

### ③ ベクターの伝染性・病原性の有無及び伝染性・病原性を有する場合はその宿主域に関する情報

ベクターの伝染性・病原性はない。

## (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

### イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

ドナープラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod 内での供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位を図 10 に示した。2 つの *piggyBac* 末端配列の間に、選抜マーカである *EGFP* 遺伝子の発現カセットと、目的遺伝子である改変 *Fibroin H* 遺伝子の発現カセットが挿入されている。

また、ベクターへの供与核酸の挿入方法の要点を図 11 に示した。

### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

ドナープラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod (図 10) をヘルパープラスミド pHA3PIG (図 12) とともに受精卵 (胚) へ顕微注入することで移入した (図 13)。ヘルパープラスミドは *piggyBac* の 2 つの末端配列のうち 1 つを欠損しているために、それ自体がカイコゲノム中に転移することはない。プラスミドを注入された胚の中の生殖細胞系列で *piggyBac* 転移酵素が働いて供与核酸がカイコゲノム中に挿入されると、その次の世代で遺伝子組換えカイコを選抜することができる (図 13)。

資料4. 審査データの概要

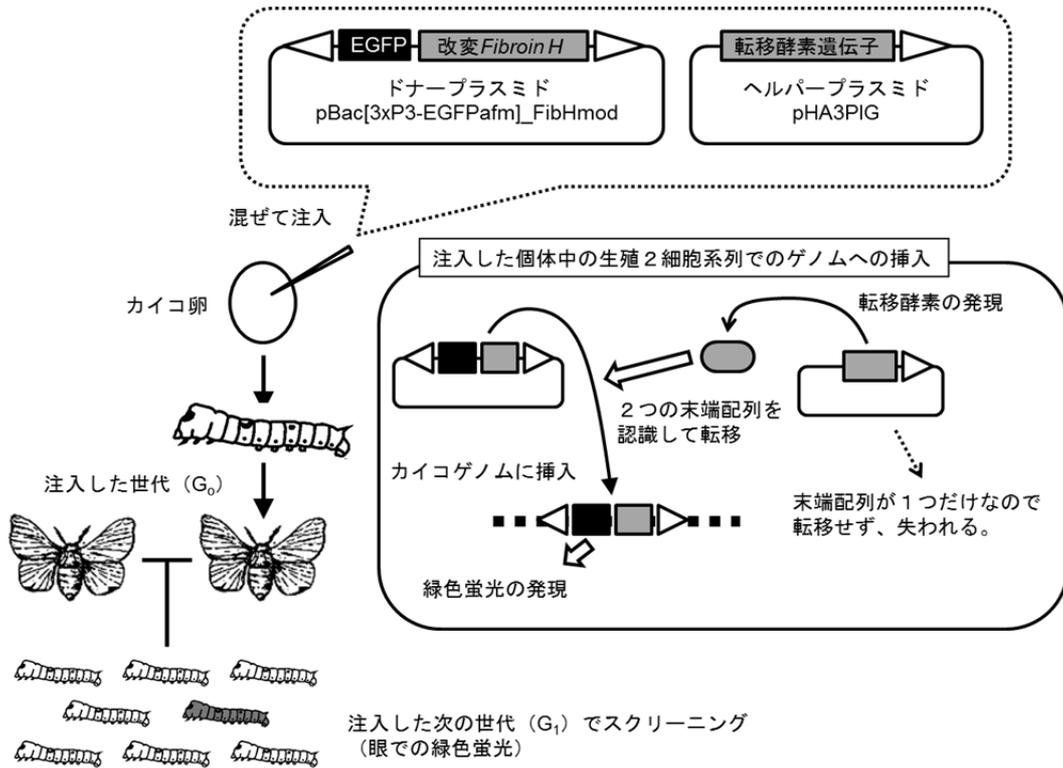


図 13. 遺伝子組換えカイコの作製方法

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された個体の選抜の方法

ドナープラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod とヘルパープラスミド pHA3PIG を顕微注入された受精卵から孵化した幼虫 (G<sub>0</sub>、図 13 及び 14) を成虫まで飼育し、兄妹交配を行って産卵させた。遺伝子組換え個体は眼で緑色蛍光タンパク質を発現することから、発生を進行させた胚を蛍光顕微鏡で観察し、眼で緑色蛍光タンパク質を発現している個体を選抜した。

資料4. 審査データの概要

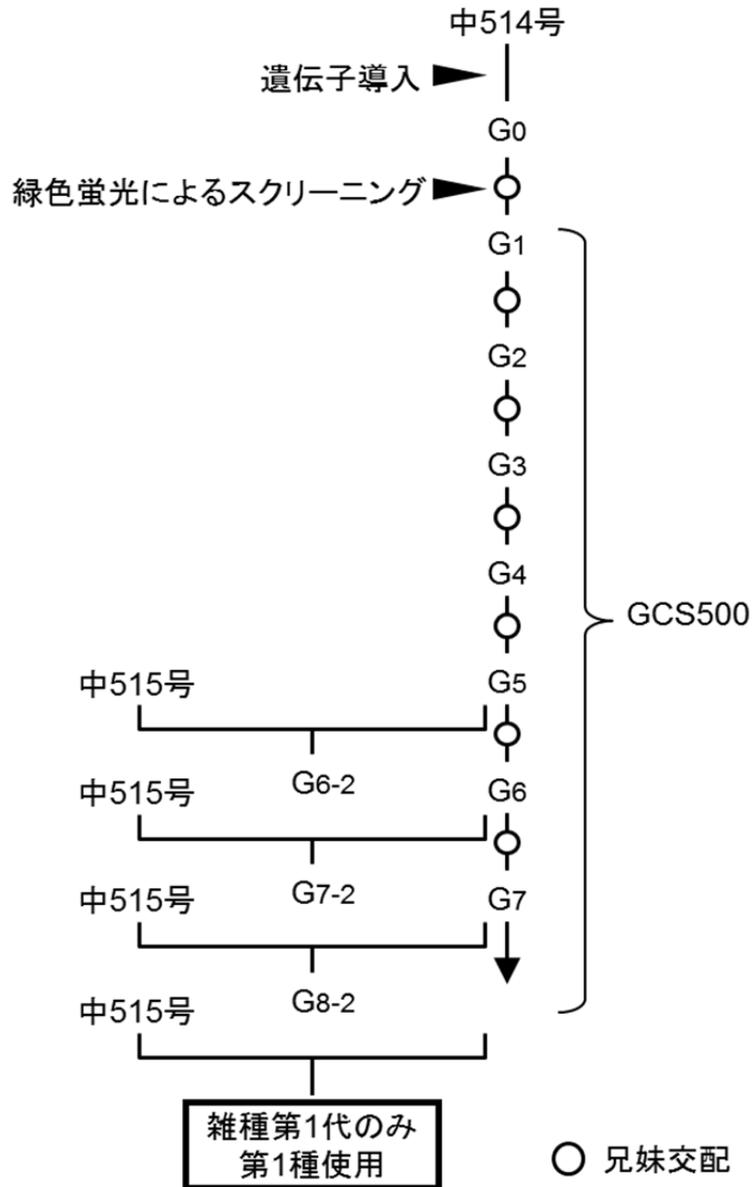


図 14. 本遺伝子組換えカイコの育成経過と世代番号

本申請の対象は、中515号系統とGCS500系統を交配した交雑第1代の個体。

資料4. 審査データの概要

表3 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために行った試験  
(世代番号は図14を参照)

試験項目	飼育世代と飼育年次					
	G <sub>3</sub>	G <sub>5</sub>	G <sub>7</sub>	G <sub>7-2</sub>	G <sub>7-2</sub>	G <sub>8-2</sub>
	2010	2012	2012	2012	2014	2015
導入した遺伝子の安定性 (サザン解析)		○	○	○		
ヘルパーの残存 (PCR)		○				
遺伝子の発現状態 (RT-PCR)			○	○		
(SDS-PAGE)						○
生理学的特性						
(幼虫の体重)					○	
(産卵数)					○	
(孵化率)					○	
(幼虫期間)					○	
(営繭率)					○	
(繭重)					○	
(繭層重)					○	
(繭糸および生糸の特性)	○					
(幼虫の行動)					○	
(産卵行動)					○	
有害物質の産生性					○	

各飼育世代で実施した試験方法及び試験結果については、別添12、別添14～27にまとめた。

## 資料4. 審査データの概要

### ② ドナープラスミドにおいて *piggyBac* 転移酵素遺伝子が欠落していることの確認

作製したドナープラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod において *piggyBac* 転移酵素遺伝子が存在していないことを、当該プラスミドの塩基配列解読により確認した。

### ③ ドナープラスミドにおける核多角体病ウイルスゲノムの断片の有無

作製したドナープラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod において、転移因子 *piggyBac* のクローニングの過程で、AcNPV (*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*) のゲノムに由来する *FP* 遺伝子 (全長 642 bp) の 5' 側断片 (340 bp) と *lef9* 遺伝子 (全長 1,548 bp) の 5' 側断片 (469 bp) が残っている。いずれの断片も、*piggyBac* 末端配列の外側にあり、カイコゲノム中には挿入されない。

### ④ ヘルパープラスミドの残存性

G<sub>5</sub> 世代の遺伝子組換えカイコ (図 14、表 3) の 5 齢幼虫の後部絹糸腺から抽出したゲノム DNA を鋳型として、転移酵素遺伝子の一部を PCR により増幅した。PCR に用いたプライマーと増幅する断片の位置を図 12 に示す。試験の結果、G<sub>5</sub> 世代の遺伝子組換えカイコのゲノム DNA から *piggyBac* 転移酵素遺伝子の増幅は認められなかった (別添 12)。このことから、本遺伝子組換えカイコにはヘルパープラスミドの配列が残存していないことが確認できた。

### ⑤ 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するまでに用いられた系統の育成の経過

閉鎖系の飼育室 (P1A) で遺伝子組換えカイコを育成し、眼での EGFP (選抜マーカー) の発現が認められる系統を選抜した。その後、兄妹交配により、目的遺伝子を持つ実用系統 GCS500 を作出し、現在まで P1A での飼育・交配により系統を維持している。育成経過を図 14 に、試験を実施した世代を表 3 に示した。

## (4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

### イ 移入された核酸の複製物が存在する場所及びコピー数

遺伝子組換えカイコ (GCS500) と非遺伝子組換えカイコ (中 514 号) との F<sub>1</sub> 同士を交配して、次代 F<sub>2</sub> での分離を幼虫の単眼での緑色蛍光により調査したところ、陽性個体と陰性個体が 3:1 に分離したことから、移入された遺伝子は染色体上に 1 コピー挿入されていると判断した (別添 13)。

## 資料4. 審査データの概要

### ロ 移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

移入された核酸の複製物が安定的に伝達されることを確認するため、本遺伝子組換えカイコの複数の世代及び非遺伝子組換えカイコについて、5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、本遺伝子組換えカイコからはすべて同じサイズのバンドが 1 本だけ検出されたことから、導入した遺伝子はカイコゲノムに安定的に維持されていると判断した（別添 14）。

なお、カイコゲノム中に、*piggyBac* を転移させる活性を持つ転移酵素をコードする遺伝子の存在は報告されていない。

### ハ 移入された核酸の複製物の個体間及び間での形質発現の安定性

移入された核酸の複製物から目的遺伝子が安定的に発現されることを確認するため、本遺伝子組換えカイコの複数の世代及び非遺伝子組換えカイコについて、5 齢幼虫の絹糸腺から全 RNA を抽出して、改変 *Fibroin H* 遺伝子を検出する RT-PCR を行ったところ、複数の遺伝子組換え個体で同程度に転写産物が検出され、一方、非遺伝子組換え個体では検出されなかったことから、本遺伝子組換えカイコにおいて目的遺伝子が安定的に発現していることが確認できた（別添 15）。また、EGFP による眼の緑色蛍光がいずれの世代でも安定して発現していることを確認している。なお、繭層中の改変フィブロイン H 鎖タンパク質の量は内在性のフィブロイン H 鎖タンパク質の量の 200 分の 1 程度であった（別添 16）。

## （5）遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

別添 14 に示したサザンハイブリダイゼーションにより、本遺伝子組換えカイコの複数の世代や個体で同等のシグナルを得ることができた。非遺伝子組換えカイコでは常にシグナルが得られなかったことから、2  $\mu$ g のゲノム DNA を用いることにより、感度良く、かつ、科学的に信頼性の高い本ゲノムサザンハイブリダイゼーション法により、非遺伝子組換え個体と区別して、本遺伝子組換えカイコを検出することが可能である。

## （6）宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

### イ 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性

本遺伝子組換えカイコでは、生糸の染色性を高めることを目的として、導入された改変 *Fibroin H* 遺伝子を、フィブロイン H 鎖遺伝子プロモーターの制御下で幼虫の後部絹糸腺で発現させる。産生された改変 *Fibroin H* タンパク質は内在性のフィブロイン H 鎖と会合することから、この導入遺伝

## 資料4. 審査データの概要

子を持つ本遺伝子組換えカイコは改変 Fibroin H タンパク質を含む絹糸を産生する。

また、選抜マーカーとして、3xP3 プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の遺伝子を発現させることにより、胚や幼虫、蛹、成虫の眼で緑色蛍光を生じさせる。

改変 Fibroin H タンパク質は、繊維タンパク質であり、他の物質を変化させるような酵素活性を有していないことから、宿主の持つ代謝系を変化させる機能を有していないと考えられる。また、EGFP も蛍光タンパク質であり、他の物質を変化させるような酵素活性を有していないことから、宿主の持つ代謝系を変化させる機能を有していないと考えられる。

### ロ 生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換えカイコと宿主の属する分類学上の種との間の相違

生理学的及び生態学的特性を調査するために、非遺伝子組換えカイコ系統「中 515 号」と遺伝子組換えカイコ系統「GCS500」との交雑種である「中 515 号×GCS500」と、非遺伝子組換えカイコ系統「中 515 号」と「中 514 号」との交雑種である「中 515 号×中 514 号」について、形質を調査・比較した (図 15)。幼虫の体重、幼虫の行動、産卵行動及び産卵数の調査においては、稚蚕期 (1 齢から 3 齢) を人工飼料で、壮蚕期 (4・5 齢) を桑葉で飼育した。それ以外の調査においては、全齢を桑葉で飼育した。

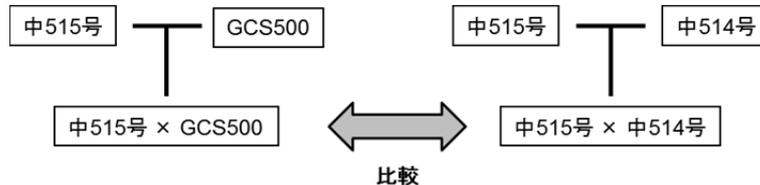


図 15. 生理学的・生態学的特性を比較する対象

#### ① 形態の特性

幼虫の各齢期の初めの摂食前に体重を調査したところ、2 齢期に本遺伝子組換えカイコは非遺伝子組換えカイコより体重が軽く、統計学的な有意差が認められた (別添 17、 $P < 0.001$ )。その他の齢期では統計学的な有意差は認められなかった (別添 17、 $P > 0.1$ )。

蛹を含む繭の重さ (繭重) 及び蛹と脱皮殻を除いた繭だけの重さ (繭層重) を比較するため、本遺伝子組換えカイコの繭 65 個 (メス 35 個、オス 30 個) と非遺伝子組換えカイコの繭 77 個 (メス 47 個、オス 30 個) を、それぞれまとめて重量を計測した。それをそれぞれの個数で割って 1 個当たりの繭重及び繭層重として比較したところ、繭重は本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコでどちらも 2.19 g となった。繭層重は本遺伝子組換えカイコで 0.427 g、非遺伝子組換えカイコで 0.443 g となり、繭層重は本遺伝子組換えカイコの方が小さかった (別添 18)。

#### 資料4. 審査データの概要

繭糸繊度は本遺伝子組換えカイコで 1.35 d、非遺伝子組換えカイコで 1.54 d であり、本遺伝子組換えカイコの方が細く、統計学的な有意差が認められた（別添 19、 $P < 0.01$ ）。生糸の強度は本遺伝子組換えカイコで 5.14 g/d、非遺伝子組換えカイコで 4.89 g/d であり、本遺伝子組換えカイコの方が 5% 高く、統計学的な有意差が認められた（別添 19、 $P < 0.01$ ）。生糸の強度は、複数の繭から引いた繭糸をまとめて一定の繊度になるように繰糸した上で計測する。今回の計測に用いた 27 d の生糸では、生糸 1 本当当たりの繭糸の平均本数は本遺伝子組換えカイコで 20.0 本、非遺伝子組換えカイコで 17.5 本であり、本遺伝子組換えカイコの方が 14% 多いことになる。従って、本遺伝子組換えカイコの方が生糸の強度が高いとしても、繭糸 1 本当当たりでは強度が低くなると考えられる。

繭色は、本遺伝子組換えカイコも対照となる非遺伝子組換えカイコも白色である。繭形はどちらも楕円である。

生糸の染色性については、ローダミンまたはフラビンどちらで染色した場合でも、本遺伝子組換えカイコの方が非遺伝子組換えカイコに比べて L 値が低く、より濃く染まっていた（別添 19、どちらも  $P < 0.01$ ）。

#### ② 生育の特性

受精卵のうち幼虫が孵化する割合である孵化歩合を調査したところ、本遺伝子組換えカイコは 91.2%、非遺伝子組換えカイコは 96.6% となり、統計学的な有意差は認められなかった（別添 20、 $P = 0.053$ ）。

幼虫期間として、孵化幼虫に最初の給餌を行ってから、繭形成開始に伴って給餌を停止するまでの期間を調査したところ、本遺伝子組換えカイコは 22 日、非遺伝子組換えカイコは 23 日であり、本遺伝子組換えカイコの方が 1 日短かった（別添 21）。なお、本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコはいずれも完全変態を行い、卵・幼虫・蛹・成虫の各段階を経る。

本遺伝子組換えカイコは、対照となる非遺伝子組換えカイコと同様、桑葉又は桑葉を含む人工飼料を幼虫期に摂食して成長する。4 齢幼虫からは、繭質や収繭量の向上及び飼料のコスト低減のために桑葉を摂食させることが有効であり、特に、枝に付いたままの桑葉を与える条桑育により労力も低減できる。なお、成虫は摂食も飲水も行わない。

#### ③ 生存能力

4 齢幼虫の最初から繭を作るまでに至った個体数の割合である営繭率を見ると、本遺伝子組換えカイコが 97.5%、非遺伝子組換えカイコが 96.6% であった。いずれにおいても途中で死亡する個体はわずかであり、2 試料間で統計学的な有意差は認められなかった（別添 22、 $P = 0.40$ ）。

## 資料4. 審査データの概要

### ④ 運動能力

幼虫が移動する範囲を比較するため、半径 18 cm の円形の枠の中心に 5 齢幼虫を 1 頭ずつ置き、12 時間後に元の位置からの距離を計測した。本遺伝子組換えカイコの平均は 2.9 cm (標準偏差 2.5 cm)、非遺伝子組換えカイコの平均は 2.9 cm (同 1.7 cm) となって、統計学的な有意差は認められなかった (別添 23、 $P = 0.97$ )。

### ⑤ 繁殖様式

カイコは有性生殖により繁殖する。

メス成虫 1 頭当たりの産卵数を比較するため、半径 18 cm の円形の枠の中心に、交尾後のメス成虫を 1 頭ずつ 24 時間置いて産卵数を調査した。本遺伝子組換えカイコの平均は 531 個 (標準偏差 179 個)、非遺伝子組換えカイコの平均は 736 個 (同 168 個) となって、本遺伝子組換えカイコの方が少なく、統計学的な有意差が認められた (別添 24、 $P < 0.001$ )。

メス成虫が産卵する範囲を比較するため、産卵数の調査に合わせて、産み付けられた卵 1 個ずつの中心からの距離を計測した。半径 18 cm の枠まで到達した場合があったため、距離の平均値を出すことはできなかったが、距離の分布を比較したところ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとで産卵する範囲に統計学的な有意差は認められなかった (別添 25、 $P = 0.085$ )。

### ⑥ 脱皮・変態・休眠等

本遺伝子組換えカイコも非遺伝子組換えカイコも幼虫脱皮の回数は 4 回であった。また、本遺伝子組換えカイコ同士、非遺伝子組換えカイコ同士を交配すると休眠卵を産む。以上のことから、内分泌系ホルモンの制御機能に違いはないものと考えられる。

### ⑦ クワコとの交雑の可能性

メス成虫が産卵する範囲を調べたところ、本遺伝子組換えカイコは半径 16 cm 以内に 91% の卵を産み、非遺伝子組換えカイコは半径 16 cm 以内に 89% の卵を産んでおり、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとで産卵の範囲に違いがなかった (別添 25)。また、産卵数を調べたところ、本遺伝子組換えカイコは非遺伝子組換えカイコよりも少なかった (別添 24)。孵化歩合 (別添 20) や幼虫の運動能力 (別添 23) には違いがなかった。また、本遺伝子組換えカイコが発現する改変 Fibroin H タンパク質及び EGFP が性フェロモンの合成を促進したり、クワコとの交尾の可能性や産卵数を高めたりするとは考えられない。また、本申請については、飼育中に発生した糞や食べ残しの餌などの飼育残渣については、混入しているカイコを取り除

#### 資料4. 審査データの概要

いてから粉砕処理することとしている。予め、非遺伝子組換えカイコを使用して実施した試験では、繭は飼育残渣中の枝や糞の中で目立つ色をしていることから、取り除くことが可能であり、繭を作らなかった蛹や繭を作るのが遅れた幼虫が、見落とされて飼育残渣に混入したとしても、粉砕器による粉砕処理ですべて死亡したことから、成虫が生じることはない(別添 28)。以上のことから、非遺伝子組換えカイコに比べて本遺伝子組換えカイコがクワコと交尾する機会が増加する可能性は認められず、また、生じる交雑個体が多くなったり、交雑個体の生存性が高まったりする可能性はないものと考えられる。

#### ⑧ 病原性

カイコが、他の生物に対して病原性を有するという報告はない。また、本遺伝子組換えカイコが産生する改変 Fibroin H 蛋白質は繊維タンパク質として機能するものであり、病原性を有するとは考えられない。また、本遺伝子組換えカイコが産生する EGFP が病原性を有するという報告もない。したがって、本遺伝子組換えカイコが他の生物に対して病原性を有するとは考えられない。

#### ⑨ 有害物質の産生性

飼育残渣を屋外に廃棄した場合に、そこに含まれる本遺伝子組換えカイコの糞や死体が植物に影響を与える可能性があるかどうか、ブロッコリーの発芽・生育に与える影響を調査したところ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間に差は認められなかった(別添 26)。同様に、土壤微生物に与える影響についても調査したところ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間に差は認められなかった(別添 27)。

本遺伝子組換えカイコが産生する改変 Fibroin H タンパク質は、繊維タンパク質であるフィブロイン H 鎖タンパク質の一部のアミノ酸配列を改変したものであり、改変した領域について、既知の有毒タンパク質と類似のアミノ酸配列を有するかどうか、Toxin and Toxin Target Database (<http://www.t3db.org/>) で FASTA 検索を行ったところ、既知の有毒タンパク質と類似の配列は認められなかった。また、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうかを、アレルゲンデータベース (Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)、ver. 13、<http://www.allergenonline.org/>) に対して FASTA 検索を行ったところ、食品安全委員会において遺伝子組換え食品の既知アレルゲンとの相同性検索の指標とされている連続 8 アミノ酸残基の相同性を示す配列は認められなかった。

また、EGFP は様々な遺伝子組換え実験を通じ、多数の使用実績を有するタンパク質であり、有害物質であるとの報告はない。生態系に対し問題を起こすタンパク質とは認識されておらず、高校生向けの遺伝子組換え実験用のキットが市販されている。既知の有毒タンパク質と類似の

## 資料4. 審査データの概要

アミノ酸配列を有するかどうか、Toxin and Toxin Target Database (<http://www.t3db.org/>) で FASTA 検索を行ったところ、既知の有毒タンパク質と類似の配列は認められなかった。また、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうかを、アレルゲンデータベース (Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)、ver. 13、<http://www.allergenonline.org/>) に対して FASTA 検索を行ったところ、既知アレルゲンと類似の配列は認められなかった。

さらに、本申請においては飼育残渣を廃棄する際はカイコの繭を取り除くなどしていることから、飼育残渣に含まれて屋外に廃棄される可能性のある本遺伝子組換えカイコはきわめて少量であると考えられ、脊椎動物等が捕食することによる有害物質の影響は想定されない。

### ハ 遺伝子組換えカイコと宿主の属する分類学上の種との識別の方法

本遺伝子組換えカイコは眼に緑色蛍光タンパク質を発現することから、非遺伝子組換えカイコとの区別は容易である。また、別添 14 に示したサザンハイブリダイゼーションにより、非遺伝子組換えカイコと区別して、本遺伝子組換えカイコを感度良く検出及び識別することが可能である。

## 3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

本申請においては、改変 Fibroin H タンパク質を含有する絹糸の特性・加工法を調査・研究するための材料を確保すること、及び、将来の養蚕農家での飼育を想定して生育経過などの調査を行うことを目的として、本遺伝子組換えカイコを、隔離して飼育するための隔離飼育区画において3齢幼虫期以降から繭の形成まで飼育するものである。

### (1) 使用等の内容

隔離飼育区画における幼虫の飼育(3齢幼虫期以降から繭の形成まで)並びに繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

### (2) 使用等の方法

**隔離飼育区画の所在地:** 群馬県前橋市総社町総社 2326 番地 2

**隔離飼育区画の名称:** 群馬県蚕糸技術センター 遺伝子組換えカイコ飼育調査区画

**隔離飼育区画の使用期間:** 承認日から平成 33 年 3 月 31 日まで

**隔離飼育区画内の施設の内容:** 「資料 1. 第一種使用規定承認申請書の別紙 1 隔離飼育区画の施設内容及び受容環境」のとおりとする。

**隔離飼育区画の要件:**

## 資料4. 審査データの概要

### イ 次に掲げる設備を有すること

① 施設内への部外者の立入りを防止するため、遺伝子組換えカイコを隔離して飼育するための遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（以下「隔離飼育区画」という。）を取り囲むように金属製フェンス（高さ 1.8 m）を設置している。

② 遺伝子組換えカイコを飼育する区画であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。

③ 隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室は鋼管による骨組みで、内側の網（4mm 目以下）と外側のフィルムで二重に被覆している。外側のフィルムは、天井、妻面、側面に開閉可能な部分があるが、内側の網は開閉しない（出入口を除く。）。

④ 隔離飼育区画内のプレハブ蚕室は屋根、壁、戸、窓を備え、開閉可能な窓、戸（出入口を除く。）及び換気口には 4mm 目以下の網を張っている。

⑤ 隔離飼育区画内の残渣処理室は鋼管による骨組みで、全体を網（4mm 目以下）で覆い、天井部外側をフィルムで被覆している。内側に網を保護する合板（高さ 0.9m）を設置している。

⑥ 不活化処理で用いる冷凍庫（ $-30^{\circ}\text{C}$ ～ $-20^{\circ}\text{C}$ 設定）の設置は、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成 15 年法律第 97 号）に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた区画とする。

### ロ 次に掲げる事項を遵守すること

① 「資料 1. 第一種使用規定承認申請書の別紙 2 作業要領」に従う。

② 「資料 2. モニタリング計画書」に基づき、モニタリングを実施する。

③ 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるにいたった場合は、「資料 3. 緊急措置計画書」に基づき、速やかに対処する。

**施設の地図及び設備の配置図：**「資料 1. 第一種使用規定承認申請書の別紙 1 隔離飼育区画の施設内容及び受容環境」を参照。

**隔離飼育区画試験の計画：**別添 29 を参照。

### (3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

「資料 2. モニタリング計画書」を参照。

### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

「資料 3. 緊急措置計画書」を参照。

#### 資料4. 審査データの概要

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

該当なし。

(6) 国外における使用等に関する情報

該当なし。

## 資料4. 審査データの概要

### 別添資料リスト

- 別添 1 カイコとクワコの生理学的及び生態学的特性の比較
- 別添 2 日本国内におけるクワコの分布に関する調査（非公開）
- 別添 3 クワコ成虫の発生時期に関する調査（非公開）
- 別添 4 自然界におけるカイコの生存能力に関する調査
- 別添 5 鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生する可能性のある鳥類・昆虫類
- 別添 6 カイコから日本各地の野生のクワコ集団への遺伝子流入に関する調査（非公開）
- 別添 7 養蚕農家周辺でのカイコとクワコの交雑第一代の生存能力に関する調査（非公開）
- 別添 8 カイコとクワコの交雑後代の妊性に関する調査
- 別添 9 自然界におけるカイコとクワコの交雑第一代の生存能力に関する調査（非公開）
- 別添 10 目的遺伝子の塩基配列（非公開）
- 別添 11 ヘルパープラスミドの塩基配列（非公開）
- 別添 12 遺伝子導入に用いたヘルパープラスミドが残存していないことの確認
- 別添 13 移入された核酸の複製物が染色体に1コピー存在することの確認
- 別添 14 移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性
- 別添 15 移入された核酸の複製物の個体間及び子孫系統間での発現の安定性
- 別添 16 改変フィブロインH鎖タンパク質の発現量
- 別添 17 幼虫体重の比較
- 別添 18 繭重及び繭層重の比較
- 別添 19 繭糸および生糸の特性
- 別添 20 孵化歩合の比較
- 別添 21 幼虫期間の比較
- 別添 22 営繭率の比較
- 別添 23 幼虫の行動の比較
- 別添 24 産卵数の比較
- 別添 25 産卵行動の比較
- 別添 26 植物の発芽や生育に与える影響の比較
- 別添 27 土壌微生物に与える影響の比較
- 別添 28 粉砕機での粉砕による飼育残渣の不活化の検討（非公開）
- 別添 29 高染色性絹糸生産カイコ（改変 Fibroin H, *Bombyx mori*）（中 515 号×GCS500）隔離飼育区画試験の計画

資料4. 審査データの概要

別添1 カイコとクワコの生理学的及び生態学的特性の比較

「1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報」に関連する情報について、クワコの生理学的及び生態学的特性についての情報をとりまとめるとともに、カイコとクワコの比較を以下の表のとおりとりまとめた。

表. カイコとクワコの比較表

	カイコ	クワコ
学名	<i>Bombyx mori</i> (Linnaeus)	<i>Bombyx mandarina</i> (Moore)
国内の自然環境における生息状況	自然環境における生息の報告はない。	北海道、本州、四国、九州に分布し、南限はトカラ列島までで、奄美大島以南でのクワコの生息記録はない（河原畑、1998; 伴野・中村、1999; 別添2）。
国外の自然環境における生息状況	自然環境における生息の報告はない。	日本のほか、中国本土、朝鮮半島、台湾及び極東ロシア沿海州に生息記録がある（河原畑、1998）。
食草	幼虫はクワを摂食する。成虫は口器がなく飲水も摂食もしない。	幼虫はクワを摂食する。成虫は口器がなく飲水も摂食もしない。
幼虫の生育時期	自然環境では生育できない。	クワが葉をつけている期間（5月から11月頃）。
化性（1年間に発生する回数）	系統により、1化性、2化性、多化性がある。	主として2化性又は3化性で、標高が高い地域等では1化性になる場合もある（橋本・佐藤、1958; 別添3）。
幼虫の脱皮回数	通常は4回で、3回になることもある。	3回が多いが4回もある（大村、1950; 蟻木・竹田、1982）。
幼虫の運動性	餌がなくなっても飼育容器から外に出ない。	餌があっても動き回る。
成虫の運動性	翅はあり羽ばたくことはできるが飛ぶことは全くできない。	飛ぶことができる。
幼虫の体色	白色が多い。	灰褐色や黒褐色（名和、1936）。
幼虫の擬態行動	しない。	腹部第2体節から先を持ち上げて静止し、枝に擬態する。
繁殖様式	有性生殖	有性生殖

#### 資料4. 審査データの概要

交尾	メス成虫がボンビコールを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は歩いてメス成虫に接近する。	メス成虫がボンビコールを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は飛んでメス成虫に接近する。
産卵	歩きながら 500 個前後を産卵する。	1 個ずつ又は数個～10 数個程度ずつまとめて産卵し、1 頭のメス成虫の産卵数は 250～300 個程度（名和、1936; 大場、1939b）。

#### 【カイコとクワコの関係】

カイコと同じ *Bombyx* 属には、野生種としてクワコ (*Bombyx mandarina*) が含まれ、形態学的、遺伝学的及び分子生物学的知見から、カイコの祖先は中国のクワコであると考えられている（河原畑、1998）。中国のクワコを家畜化してカイコが作られたのが数千年前で、中国のクワコ（カイコ）と日本のクワコが分化したのは、それよりはるか以前の数百万年前であると考えられている（河原畑、1998; Yukuhiro *et al.*, 2002）。染色体数については、カイコと中国のクワコが  $2n = 56$ 、日本のクワコが  $2n = 54$  という違いがあるが、カイコと日本のクワコを人為的に交尾させると妊性を持つ交雑個体が生じる（河原畑、1998）。

#### 【クワコの国内及び国外の自然環境における生息状況】

クワコは、日本、中国本土、朝鮮半島、台湾及び極東ロシア沿海州に分布する（河原畑、1998）。日本においては、北海道、本州、四国、九州に分布し、南限はトカラ列島までで、奄美大島以南でのクワコの生息記録はない（河原畑、1998; 伴野・中村、1999; 別添 1）。クワコの幼虫はクワの葉を摂食し、桑園だけではなく、山林にクワが自生していれば生息する可能性がある。しかし、養蚕用に管理された桑園ではクワが定期的に株元まで剪定され、クワコの卵も枝とともに除去される可能性が高まることから、生息数が少なくなることが推測される。

冬季はクワが落葉するため、クワコ幼虫が生存できるのは春から秋にかけてであり、卵で越冬する（名和、1936; 大村、1950）。

クワコの成虫の発生時期については、長野県松本市では7月中旬と10月中旬の年2回程度（橋本・佐藤、1958）、茨城県つくば市大わし（標高 20m）と群馬県下仁田町下小坂（標高 280m）では6月頃、8月頃及び11月～12月頃の年3回程度（別添 3）、長野県佐久市内山峠（標高 1,000m）では9月頃の年1回程度である（別添 3）。以上のことから、地域による違いはあるものの、日本国内のクワコは主に、1年に2回世代を繰り返す2化性または、3回世代を繰り返す3化性であり、標高が高い地域では1年に1回世代を繰り返す1化性になることもある。

微粒子病を引き起こす微胞子虫 (*Nosema bombycis*) の野生のクワコにおける感染率は、1941年秋に1.4%（216頭中3頭）、1942年春に0%（156頭中0頭）であったとの報告がある（大村、1950）。

#### 資料4. 審査データの概要

##### 【中国産クワコ及び韓国産クワコ】

幼虫皮膚の斑紋と成虫の翅の形態について、中国産・韓国産・日本産それぞれのクワコ集団の間で明瞭な違いは認められないが、染色体数については、中国産クワコがカイコと同じ  $2n = 56$ 、韓国産クワコと日本産クワコでは  $2n = 54$  である（河原畑、1998; Nakamura *et al.*, 1999; Kawanishi *et al.*, 2008）。中国産クワコを飼育した結果では、日本産クワコよりも成虫や蛹が小さく、高温時でも飼育しやすいことなどが報告されている（河原畑、1998）。中国産クワコとカイコを人為的に交尾させると、妊性のある交雑個体が生じるが、交雑個体同士を交配した場合に次代の孵化率が低下するとの報告がある（中村ら、1996）。

##### 【クワコの生理学的及び生態学的特性：基本的特性】

クワコの卵は長径 1.2~1.3 mm、短径 1 mm くらいの平たい楕円形で、外側は堅い卵殻で包まれている（名和、1936; 大村、1950; 河原畑、1998）。1年に繰り返す世代の回数は主に2回又は3回（2化性又は3化性）で、標高が高い地域等では1回（1化性）になる場合もある（橋本・佐藤、1958; 別添3）。

飼育条件下での調査では、孵化してから繭を作るまでの幼虫期間は20日~30日程度だった（大村、1950）。1齢~2齢頃の間は昼間に摂食するが、成長するに従って夜間のみ摂食するようになる（名和、1936; 大村、1950）。幼虫脱皮の回数は3回（三眠蚕）が多いが、4回もある（大村、1950; 蝻木・竹田、1982）。

幼虫の体色は地域や個体ごとの変異が大きいですが、灰褐色ないし黒褐色で、胸部第2体節と腹部第2体節、腹部第5体節に明瞭な斑紋がある（名和、1936; 森、1995）。このような体色が桑樹の枝に似ている他、摂食時以外は腹部第2体節から先を持ち上げて静止することで枝に擬態する。

繭は葉を巻き込むようにしてその間に作るが、その際、枝から葉柄を通して糸で足場を作り、葉が落ちないようにする（名和、1936; 大村、1950）。羽化するまでの蛹の期間は個体による違いが大きく、20日から1か月程度から、長い場合は100日以上という例もある（大場、1939a; 大村、1950）。

成虫はオス・メスともに飛翔することができる（河原畑、1998）。メス成虫は交尾が終了するまで静止し、日中に性フェロモンを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は午前中を中心に日中に飛んだり休んだりを繰り返しながらメス成虫を探索すると考えられる（Sasaki and Jibiki, 1984）。オス成虫の生存期間として最も長い記録は21日間である（村上ら、2010）。

##### 【クワコの生理学的及び生態学的特性：生息又は生育可能な環境の条件】

クワコは幼虫期に桑葉を摂食して成長するため、生息場所はクワが生えている場所に限られ、クワが落葉する冬季は幼虫が生存することができず、卵で越冬する（名和、1936）。地域や気候によって時期は異なるが、冬を越した卵から、クワが芽吹く5月頃に幼虫が孵化し、11月から12月にはその年の最後の成虫が発生する（橋本・佐藤、1958; 別添3）。

#### 資料4. 審査データの概要

幼虫は、腹脚を用いてクワの葉や枝を確実に把握することができ、カイコに比べて移動性が高く活発に動き回る。1 齢～2 齢頃の間は昼間に摂食するが、成長するに従って夜間のみ摂食するようになる（名和、1936; 大村、1950）。飼育に際しては、餌があっても動き回るため、容器の蓋を閉めて、逃亡を防止する必要がある。

繭は葉を巻き込むようにしてその間に作るが、その際、枝から葉柄を通して糸で足場を作り、葉が落ちないようにする（名和、1936; 大村、1950）。成虫はオス・メスともに飛翔することができる（河原畑、1998）。

##### 【クワコの生理学的及び生態学的特性：繁殖又は増殖の様式】

クワコは受精によって生じた卵から発生する有性生殖を行う。

蛹からの羽化（成虫の発生）は、午前中に起きるという報告（大村、1950）や、オスの羽化が午前中を中心に、メスの羽化が午後を中心に起きるという報告（Kuwahara, 1984）がある。

メス成虫は羽化後もその場にとどまり、尾部のフェロモン腺から性フェロモン（ボンビコール）を大気中に放出してオス成虫を誘引して交尾する（Kuwahara *et al.*, 1984; Daimon *et al.*, 2012）。オス成虫は昼行性で、日中に飛翔するため、ボンビコールを用いたフェロモントラップでのオス成虫の捕獲は午前中が中心となる（Sasaki and Jibiki, 1984; Kuwahara, 1984）。成虫はオス・メスともに夜間に灯火に誘引される例が報告されているが、クワの害虫としてのクワコの防除として、灯火誘殺は必ずしも効果的ではないとされている（名和、1936; 大場、1939b）。

メス成虫は、1 個ずつ、又は数個～10 数個程度ずつまとめて卵を産みつけ、1 頭のメス成虫が産む卵の総数は 250 個～300 個程度である（名和、1936; 大村、1950）。自然条件下では、クワの葉や樹皮に産み付けることが一般的であるが、クワの近くに生えているサクラやケヤキに産み付けた例もある（大村、1950）。飼育条件下では、メス成虫を入れている紙袋やプラスチック籠などにも産卵する（中村ら、1999）。交尾したメス成虫は、1 夜のうちに産卵を終えると考えられる（大村、1950）。

冬を越して春に孵化する越冬卵では、卵から幼虫が出てくる孵化は一斉に起きるのではなく、4 月頃から始まって 2 か月以上にわたって徐々に起きる（大場、1939a; 大村、1950）。孵化率は、自然条件下では寄生蜂による被害を受けるため一定しない。飼育条件下での孵化率は変異が大きいが、概ね 80% 程度と報告されている（大村、1950）。春に生まれた個体が産卵すると、休眠しないで胚発生が進む不越冬卵となり、この場合は、産卵から 10 日程度で一斉に孵化する（大村、1950）。

##### 【クワコの生理学的及び生態学的特性：捕食・寄生される可能性】

野生のクワコは、卵の時期には、寄生蜂による寄生を受ける（名和、1936）。その寄生率は年や場所によって大きく異なるが、最大で 90% を超えることがある（大村、1950）。幼虫期には、カイコノウジバエとクワコヤドリバエが寄生するほか、アシナガバチによって捕食され、蛹期には、ヒラタヒメバチとアシプトコバチが寄生することが報告されている（名和、1936）。

## 別添4 自然界におけるカイコの生存能力に関する調査

## 【調査方法】

カイコが屋外に逸出する状態を模して、1 m 四方で深さ 30 cm の穴を、独立行政法人農業生物資源研究所（現在は国立研究開発法人農業生物資源研究所）大わし地区（茨城県つくば市）の屋外に掘り、その穴の中心にカイコ（C108 系統）の幼虫又は成虫を置いて生存率を調査した。幼虫を置く場合は桑葉を1日1回供給した。必要に応じて、穴に網や網室をかぶせて、飛翔性昆虫や鳥類による捕食を避けるとともに、カイコが穴から出ることを防いだ。

## 【結果】

## (1) 4 齢幼虫での調査（2008 年 5 月）

4 齢 2 日目の幼虫 500 頭を置いた。穴全体を網で覆って放置したところ、アリやシデムシによる攻撃を受け、2 日後になると、生存個体はまったく観察されなかった。（気象条件：表 1）

## (2) 5 齢幼虫での調査（2008 年 5 月から 6 月）

5 齢（終齢）2 日目の幼虫 100 頭を置いた。穴全体を網で覆って鳥類やハチなどの飛翔性動物による捕食を排除した状態で放飼したところ、幼虫は周囲には移動せず穴の中心にとどまっていた。一部はアリやシデムシによる攻撃を受けたが、最終的に 62 頭が熟蚕となってワンダリング（繭形成の場所を探して動き回ること）を開始し、穴の周辺部へ移動するものも現れた。さらにその一部は糸を吐いていたが繭を作ることはできなかった。最終的には蛹・成虫ともに観察されなかった。（気象条件：表 1）

表 1. 2008 年 5 月から 6 月の調査期間中の気象条件（気象庁・つくば市館野）

月日	天気 (6 時-18 時)	最低気温 (°C)	最高気温 (°C)	平均湿度 (%)	降水量 (mm)	調査
5/20	雨後曇	14.1	23.7	79	57.5	5 齢調査・開始(雨の後)
5/21	快晴	8.5	25.2	61	-	
5/22	晴後曇	11.8	25.8	74	-	
5/23	晴	15.3	28.5	66	-	4 齢調査・開始
5/24	晴後曇一時雨	16.3	27.0	77	14.5	
5/25	曇一時雨	17.5	22.7	92	15.0	4 齢調査・終了(死滅)
5/26	晴	15.9	26.9	78	8.5	
5/27	薄曇後晴	13.4	26.3	66	-	
5/28	曇一時雨	12.6	22.9	74	0.0	5 齢調査・繭形成開始
5/29	雨	13.0	14.8	92	17.5	
5/30	曇	11.8	16.1	89	0.5	
5/31	雨一時曇	12.1	13.9	91	8.5	
6/1	晴	10.1	22.6	75	-	
6/2	曇	13.6	22.0	80	0.0	
6/3	雨	14.1	15.8	92	21.0	
6/4	曇後晴	14.4	21.7	77	-	
6/5	曇時々雨	14.4	21.5	87	1.0	
6/6	曇時々晴	17.9	28.0	79	0.5	5 齢調査・死滅
6/7	曇時々晴	16.4	25.0	70	-	
6/8	曇	17.4	23.6	82	-	
6/9	雨一時曇	16.7	23.0	91	1.5	5 齢調査・最終確認

#### 資料4. 審査データの概要

##### (3) 5 齢幼虫での調査 (2008 年 7 月から 8 月)

5 齢 2 日目の幼虫を 2 つの穴に 200 頭ずつ置いた。1 つの穴は覆いをしないですべての捕食者による捕食の影響を観察し、もう 1 つの穴は全体を網室で覆ってアリなどの徘徊性の捕食者による影響を観察した。覆いをしなかった方は、2 日後には生存個体も死体も観察されなかった。覆いをした方では幼虫は穴の中心にとどまり、一部はアリやシデムシによる攻撃を受けたが、8 日後には 97 頭が繭形成を開始した。最終的に確認できた繭は 5 個で、そのまま放置して観察を続けたが成虫が確認できなかったため、繭形成開始から 20 日目に繭を回収して内部を調べた。3 個については繭の中にあるうちに蛹が食われた様子で、1 個は羽化した蛾が繭の中で死んでいて、1 個は羽化した可能性があったが網室内には蛾は確認されなかった。(気象条件：表 2)

表 2. 2008 年 7 月から 8 月の調査期間中の気象条件 (気象庁・つくば市館野)

月日	天気 (6 時-18 時)	最低気温 (°C)	最高気温 (°C)	平均湿度 (%)	降水量 (mm)	調査
7/25	晴	23.0	32.7	81	0.0	調査開始
7/26	曇	23.2	28.6	84	0.0	
7/27	曇	21.8	30.1	88	9.5	覆い無・終了 (死滅)
7/28	曇	20.5	30.9	81	0.0	
7/29	晴	21.3	31.1	76	0.0	
7/30	曇時々晴	20.6	29.4	78	0.0	
7/31	曇後晴	20.7	28.3	77	-	
8/1	曇一時晴	21.3	30.6	77	-	
8/2	曇後晴	22.6	33.1	75	-	覆い有・繭形成開始
8/3	晴	24.1	34.3	76	-	
8/4	曇後晴	25.3	34.2	78	0.0	覆い有・繭 5 個確認
8/5	曇一時雨	23.7	26.6	90	0.5	
8/6	晴	23.6	33.2	78	0.0	
8/7	晴	23.6	35.5	73	-	
8/8	晴	24.0	34.5	79	-	
8/9	晴	23.1	29.9	76	0.0	
8/10	曇一時雨	22.1	26.9	73	0.0	
8/11	曇後晴	23.2	30.5	78	0.0	
8/12	曇後晴	23.6	30.7	79	-	
8/13	曇時々晴	24.5	33.8	73	-	
8/14	薄曇後晴	23.9	34.3	77	0.0	
8/15	薄曇後晴	23.0	35.9	73	-	
8/16	曇時々晴	23.4	31.6	82	36.5	
8/17	雨一時曇	18.2	23.5	89	6.5	
8/18	曇一時晴	17.3	27.6	78	-	
8/19	曇	21.3	30.6	86	25.5	
8/20	晴後曇一時雨	21.1	31.2	82	3.0	
8/21	晴後一時曇	18.6	30.2	81	42.0	覆い有・繭を回収

## 資料4. 審査データの概要

### (4) 5 齢幼虫での調査 (2012 年 5 月)

5 齢 2 日目の幼虫を 1 つの穴に 200 頭置いた。網などによる覆いはしなかった。ビデオ撮影を行いながら観察したところ、2 日後の朝にはムクドリによる捕食が始まり、約 2 時間ですべてが捕食された。アリによる攻撃も観察された。(気象条件：表 3)

表 3. 2012 年 5 月の調査期間中の気象条件 (気象庁・つくば市館野)

月日	天気 (6 時-18 時)	最低気温 (°C)	最高気温 (°C)	平均湿度 (%)	降水量 (mm)	調査
5/24	薄曇時々晴	12.7	27.6	71	-	調査開始
5/25	雨一時曇	16.0	22.1	83	12.5	
5/26	薄曇	12.9	24.1	68	0.0	終了 (死滅)

### (5) 5 齢幼虫での調査 (2012 年 7 月)

5 齢 2 日目の幼虫を 1 つの穴に 200 頭置いた。網などによる覆いはしなかった。ビデオ撮影を行いながら観察したところ、ただちにアリによる攻撃が始まったが、穴から出るカイコは観察されなかった。最終的には、3 日後の夕方から 4 日後の朝までビデオ撮影が中断している間にすべていなくなっていた。(気象条件：表 4)

表 4. 2012 年 7 月の調査期間中の気象条件 (気象庁・つくば市館野)

月日	天気 (6 時-18 時)	最低気温 (°C)	最高気温 (°C)	平均湿度 (%)	降水量 (mm)	調査
7/23	薄曇一時晴	19.5	29.0	80	0.0	調査開始
7/24	曇後時々雨	21.2	29.6	83	0.0	
7/25	曇	22.3	32.5	78	0.0	
7/26	曇後晴	24.0	33.9	76	-	
7/27	晴後一時薄曇	24.6	35.6	72	0.0	終了 (死滅)

### (6) 5 齢幼虫での調査 (2012 年 9 月)

5 齢 2 日目の幼虫を 1 つの穴に 200 頭置いた。網などによる覆いはしなかった。ただちにアリによる攻撃が始まったほか、スズメバチによる捕食も観察された。4 日後にはすべていなくなっていた。(気象条件：表 5)

表 5. 2012 年 9 月の調査期間中の気象条件 (気象庁・つくば市館野)

月日	天気 (6 時-18 時)	最低気温 (°C)	最高気温 (°C)	平均湿度 (%)	降水量 (mm)	調査
9/20	晴一時曇	22.3	29.2	86	0.0	調査開始
9/21	雨時々曇	19.5	25.8	91	16.5	
9/22	曇時々雨	18.8	23.9	91	4.0	
9/23	雨	17.1	20.9	94	30.0	
9/24	晴後時々薄曇	16.4	27.2	80	-	終了 (死滅)

## 資料4. 審査データの概要

### (7) 成虫での調査 (2012年6月)

羽化当日の未交尾のメス成虫を1つの穴に200頭置いた。網などによる覆いはしなかった。ビデオ撮影を行いながら観察したところ、開始から5時間後にはほとんどの個体がアリによる攻撃を受けて体が分断されるなどして死亡しており、7時間後には生存個体がいなくなった。(気象条件：表6)

表6. 2012年6月の調査期間中の気象条件 (気象庁・つくば市館野)

月日	天気 (6時-18時)	最低気温 (°C)	最高気温 (°C)	平均湿度 (%)	降水量 (mm)	調査
6/15	薄曇	14.1	21.0	71	-	調査開始・終了

表7. 屋外でのカイコの生存に関する調査

放飼開始時期	覆いの 有無	放飼開始時の 個体数	熟蚕数	成虫発生数	成虫生存数 (7時間後)
4齢2日目	有	500	0	0	-
5齢2日目	有	300	159	0*	-
5齢2日目	無	800	0	0	-
羽化当日	無	200	-	-	0

\*羽化の可能性のある繭が1個見つかったが成虫は確認されなかった。

### 【考察】

屋外の穴に幼虫(4齢500頭、5齢の合計1,100頭)や成虫(200頭)を置いたところ、ほぼすべてが鳥類やハチ、アリ、シデムシなどに捕食されることが示された。ただし、穴全体を網で覆って鳥類やハチなど飛翔性の捕食者を排除するという条件下では5齢幼虫1頭が成虫になった可能性が認められた。

幼虫を穴に置いた際に生存個体も死体もなくなったという場合、鳥類などに捕食されるほかに、幼虫が穴から自ら出た可能性も考えられた。しかし、穴全体を網や網室で覆った観察でもビデオ撮影による観察でも、周辺部への移動は観察されなかった。繭形成のために運動が活発になる時期よりも前に、網で覆わなかった穴から幼虫がいなくなったのは捕食によるものと考えられる。

また、5齢幼虫の一部が生存して成虫になっても、ただちにアリなどに捕食されて死亡することがわかった。

### 【結論】

以上の結果から、屋外にカイコが逸出しても、野生のクワコと交尾可能な成虫が生じる可能性はきわめて低いものと考えられる。

別添5 鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生する可能性のある鳥類・昆虫類

野外におけるカイコの潜在的な捕食動物として、群馬県前橋市において鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生することが考えられる野生の鳥類・昆虫類を以下に挙げる。

鳥類

ムクドリ（観察による）

カラス類（観察による）

昆虫類

カイコノウジバエ（横山、1929）

クワコヤドリバエ（横山、1929）

ブランコヤドリバエ（横山、1929）

ハサミムシ類（横山、1929）

カマドウマ類（横山、1929）

ウマオイ類（横山、1929）

ハネカクシ類（横山、1929）

ゴミムシ類（横山、1929）

アシナガバチ類（横山、1929）

スズメバチ類（飯塚・行弘、2007）

アリ類（横山、1929）

別添8 カイコとクワコの交雑後代の妊性に関する調査

カイコとクワコの交雑個体及びその後代が妊性を持つかどうかを調査した。

【方法】

カイコ（中145号×日140号）のメスとクワコのオスとを野外で交尾させ、得られた受精卵から孵化した交雑第1代の幼虫を3齢幼虫まで室内で飼育した後、約250頭を網室（図1、2）内の桑樹に放飼した。

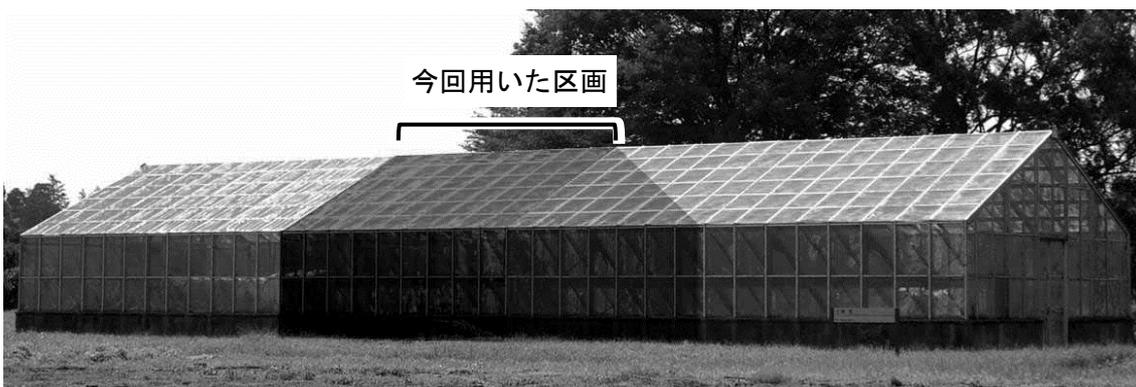


図1. 網室の外観。

全体が3つの区画に分かれていて、中央の灰色に塗った部分が今回用いた区画。

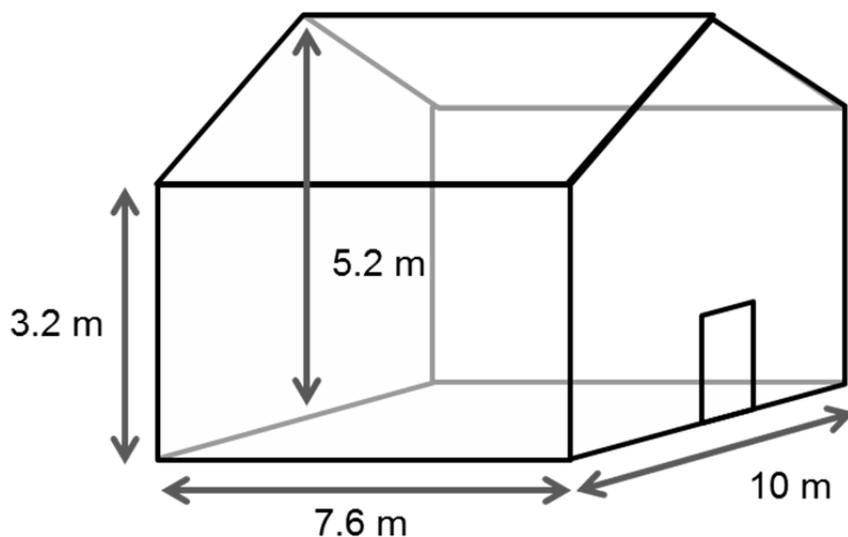


図2. 使用した区画の大きさ

網室内には、桑樹が5本ある。下草の除草や桑樹の剪定等の管理を1年に1回以上行い、その際に、交雑個体の後代が生存していることを確認した。

## 資料4. 審査データの概要

### 【結果】

2008年夏に網室内に交雑第1代の幼虫を放飼した後、成虫の発生が確認された。その後、2012年夏に繭を回収して試験を終了するまで、網室の中で交雑個体の後代が継続的に生存していることは、年に1回以上確認された。なお、網室内には、主要な捕食者である鳥類及びハチ類は生息しておらず、交雑個体が捕食される様子も観察されていない。

### 【考察】

本試験で得られた結果は、カイコとクワコの交雑個体及びその後代に妊性があり、捕食や競合がない条件で野外でも生存できることを示している。室内での飼育としては、児玉（1927）がF<sub>3</sub>まで、見波・大場（1939）がF<sub>4</sub>まで、それぞれ経代飼育の結果を報告している。このことから、カイコとクワコの交雑個体及びその後代には妊性があることが確認できる。

別添 12 遺伝子導入に用いたヘルパープラスミドが残存していないことの確認

【方法】

G<sub>5</sub>世代の遺伝子組換えカイコ (GCS500 系統) の5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、0.5 μg を鋳型として、KOD-plus を用いて 30 サイクルの PCR を行い、転移酵素遺伝子の一部を増幅した。検出限界を示すため、ヘルパープラスミドを段階希釈して鋳型とした PCR も行った。PCR は 50 μl の反応系で行い、そのうち 5 μl を 1% アガロースゲルで電気泳動した。

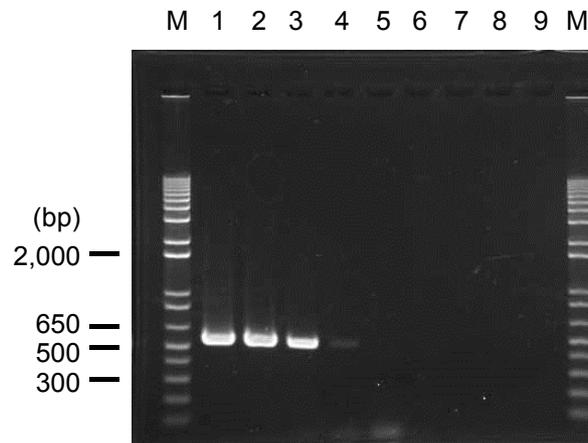
プライマーの塩基配列は以下のとおり。

pig-TP4868U25: 5'-TATATCCCAAACAAGCCAAGTAAGT-3'

pig-TP5394L23: 5'-CCACCTATTCGTCTTCCTACTGC-3'

【結果】

仮にカイコゲノム中に 1 コピーの *piggyBac* 転移酵素遺伝子が挿入されているとすると、カイコゲノム 0.5 μg に相当するヘルパープラスミドの量は約 6 pg となる。PCR の結果、図のとおり、予想されるサイズ (550bp) のバンドが、ヘルパープラスミド 0.4 pg から検出できた一方、本遺伝子組換えカイコのゲノム DNA 0.5 μg からは検出されなかったことから、本遺伝子組換えカイコにはヘルパープラスミドの配列が残存していないことが確認できた。



- M : 分子量マーカー
- 1 : ヘルパーDNA 4 ng (カイコゲノム DNA 0.5 μg での 700 コピー分に相当)
- 2 : ヘルパーDNA 40 pg (7 コピー分)
- 3 : ヘルパーDNA 0.4 pg (0.07 コピー分)
- 4 : ヘルパーDNA 4x10<sup>-3</sup> pg (7x10<sup>-4</sup> コピー分)
- 5 : ヘルパーDNA 4x10<sup>-5</sup> pg (7x10<sup>-6</sup> コピー分)
- 6-9 : GCS500 ゲノム DNA 0.5 μg (それぞれ別個体)

別添 13 移入された核酸の複製物が染色体に1コピー存在することの確認

【方法】

遺伝子組換えカイコ（GCS500 系統）と非遺伝子組換えカイコ（中 514 号系統）との F<sub>1</sub> 同士を交配して、次代（F<sub>2</sub>）での分離を解析した。1 ペア（蛾区）の卵から孵化した幼虫の単眼を蛍光実体顕微鏡で観察し、選抜マーカーである緑色蛍光タンパク質の発現の有無を確認した。

【結果】

F<sub>2</sub> 世代の孵化幼虫 292 頭のうち、単眼で緑色蛍光を発現している個体が 220 頭（75.3%）、発現していない個体が 72 頭（24.7%）であった。F<sub>2</sub> 世代で優性マーカーである緑色蛍光を発現している個体が約 4 分の 3 であったことから、導入遺伝子は GCS500 系統のゲノム中に 1 コピー挿入されていると考えられる（二項検定で  $P = 0.89$ ）。

## 別添 14 移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

## 【方法】

遺伝子組換えカイコ GCS500 系統の複数の世代 (G<sub>5</sub> 世代及び G<sub>7</sub> 世代)、GCS500 系統と非遺伝子組換えカイコ (中 515 号系統) の F<sub>1</sub> (G<sub>7.2</sub> 世代) 及び非遺伝子組換えカイコ (中 515 号系統と中 514 号系統の F<sub>1</sub>) から 6 頭ずつについて、5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、ゲノムサザンハイブリダイゼーションを行った。

ゲノム DNA (2 µg) を制限酵素 *Msp* I で消化したのち、0.8 % アガロースゲルで電気泳動を行い、ナイロンメンブレン Hybond-N+ にトランスファーした。プローブは、審査データ概要本文中の図 10 に示すように piggyBac R に設定し、PCR で作製した (691 bp)。プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

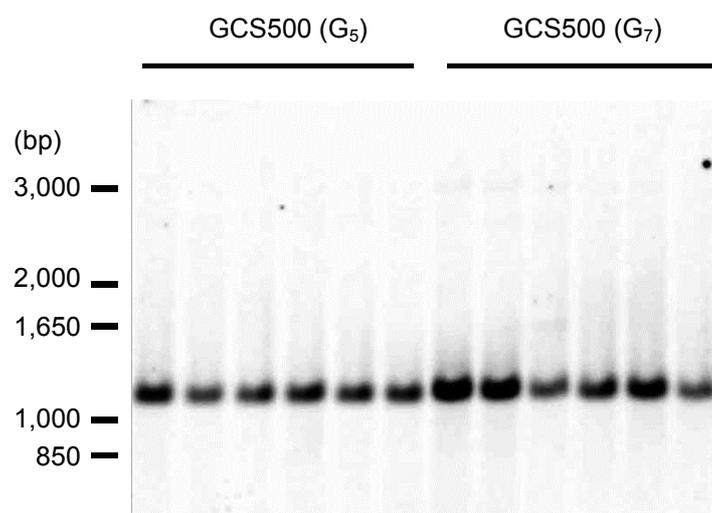
Rarm-5: 5'-TGTTTTATCGGTCTGTATATCGAGG-3'

Rarm-3: 5'-GGTGGCCTATGGCATTATTGTACGG-3'

得られた PCR 産物を AlkPhos Direct Kit (GE ヘルスケア社製) を用いてラベルし、CDP-*Star* を基質として化学発光で検出した。

## 【結果】

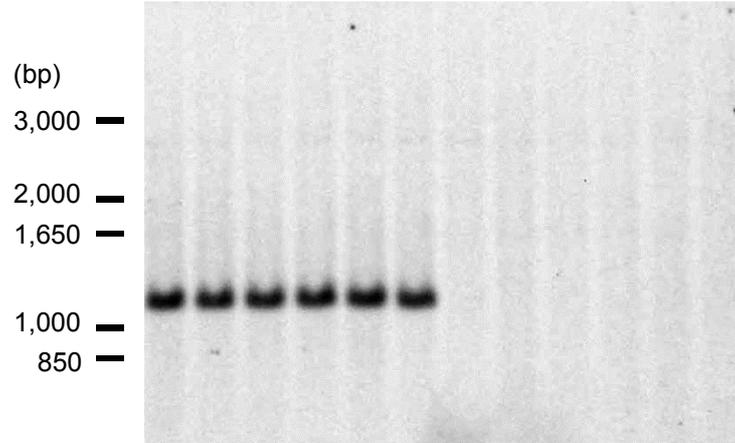
図に示すように、移入された遺伝子はカイコゲノムに安定的に維持されている。



資料4. 審査データの概要

中 515 号×GCS500  
(G<sub>7-2</sub>)

中 515 号×中 514 号  
(非組換え)



別添 15 移入された核酸の複製物の個体間及び世代間での発現の安定性

【方法】

遺伝子組換えカイコである GCS500 系統 (G<sub>7</sub> 世代)、GCS500 系統と非遺伝子組換えカイコ (中 515 号系統) の F<sub>1</sub> (G<sub>7.2</sub> 世代)、非遺伝子組換えカイコである中 514 系統、中 515 系統と中 514 系統の F<sub>1</sub> を同時期に飼育して、それぞれ 3 個体について、5 齢幼虫の後部絹糸腺から全 RNA を抽出して、フィブロイン H 鎖遺伝子に挿入した改変領域を検出する RT-PCR を行った。RNA はそれぞれ 1 μg ずつを用い、逆転写酵素 AMV Reverse Transcriptase XL (タカラバイオ) によって cDNA を合成し、そのうちの 20 分の 1 を鋳型として LA Taq (タカラバイオ) で PCR を行った。プライマーは生物多様性影響評価書中の図 10 に「RT-PCR の範囲」として図示している部分を増幅するように設定し、その塩基配列は以下のとおりである。

KS446: 5'-CGCTCTGCAGTATGTCGCTTATA-3'

KS447: 5'-GCCGACGTTACGACGAGAATAGT-3'

PCR は 10 μl の反応系で行い、そのうちの 3 μl を 2% アガロースゲルで電気泳動した。

また、RT-PCR のポジティブコントロールとして、*rp49* 遺伝子 (リボソームタンパク質遺伝子、アクセッション番号 NM\_001098282) の PCR も行った。*rp49* 遺伝子のプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

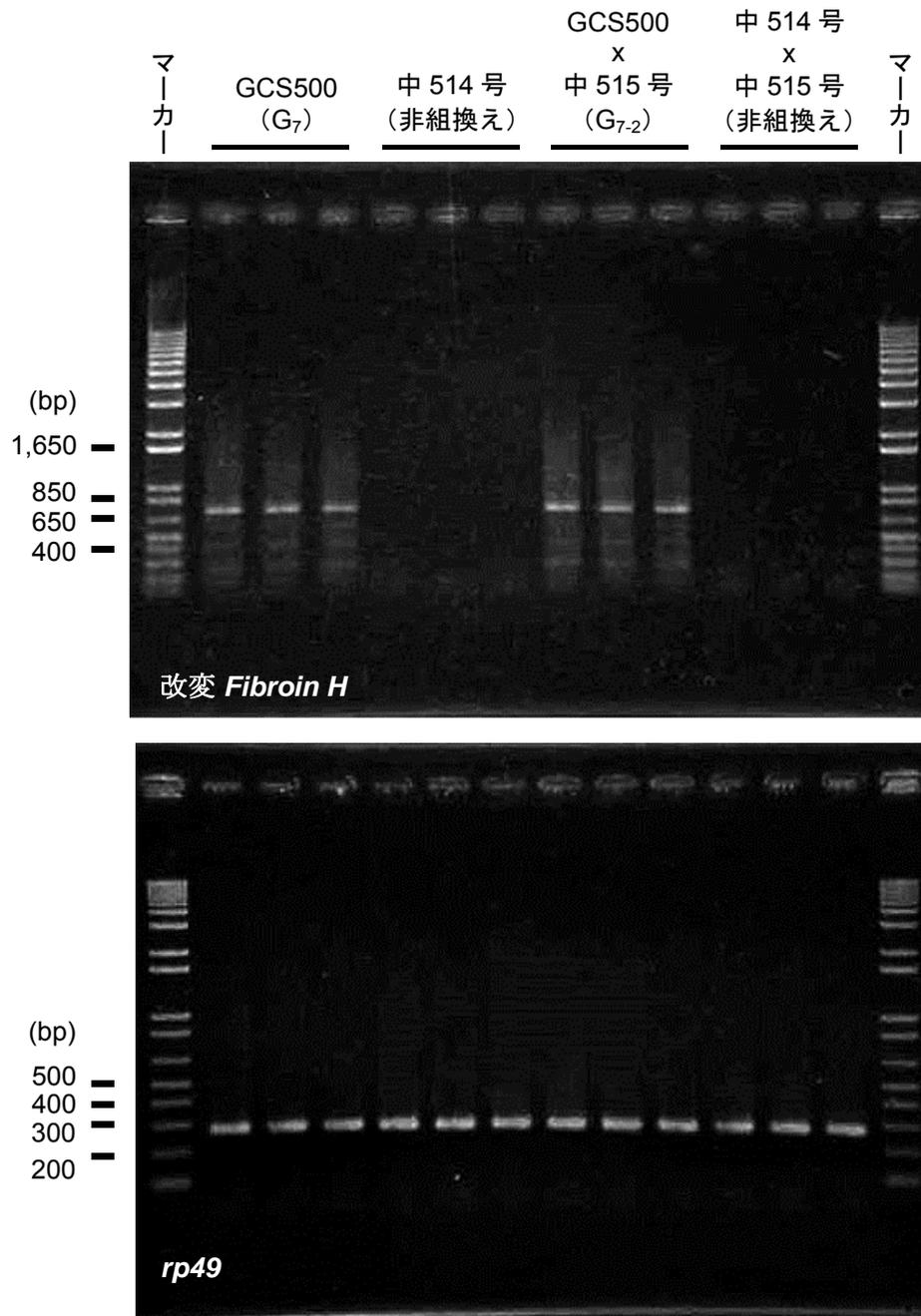
ks13: 5'-GGATCGCTATGACAACTTAAGAGGA-3'

ks12: 5'-TGCTGGGCTCTTTCCACGA-3'

【結果】

図のとおり、予想されるサイズ (748 bp) の改変領域の PCR 産物が、遺伝子組換えカイコすべてで同程度に検出され、一方、非遺伝子組換えカイコでは検出されなかった。また、*rp49* 遺伝子はいずれの個体からも増幅された (276 bp)。このことから、今回の申請に用いる遺伝子組換えカイコ系統では、導入遺伝子が安定的に発現していることが確認できた。

資料4. 審査データの概要



## 別添 16 改変フィブロイン H 鎖タンパク質の発現量

## 【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、繭層のタンパク質を電気泳動し、遺伝子組換えカイコで発現する改変フィブロイン H 鎖タンパク質の量を、内在性のフィブロイン H 鎖タンパク質の量を比較した。稚蚕期（1 齢から 3 齢）を人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）を桑葉で飼育した。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ 中 515 号×GCS500 (G<sub>8-2</sub>)

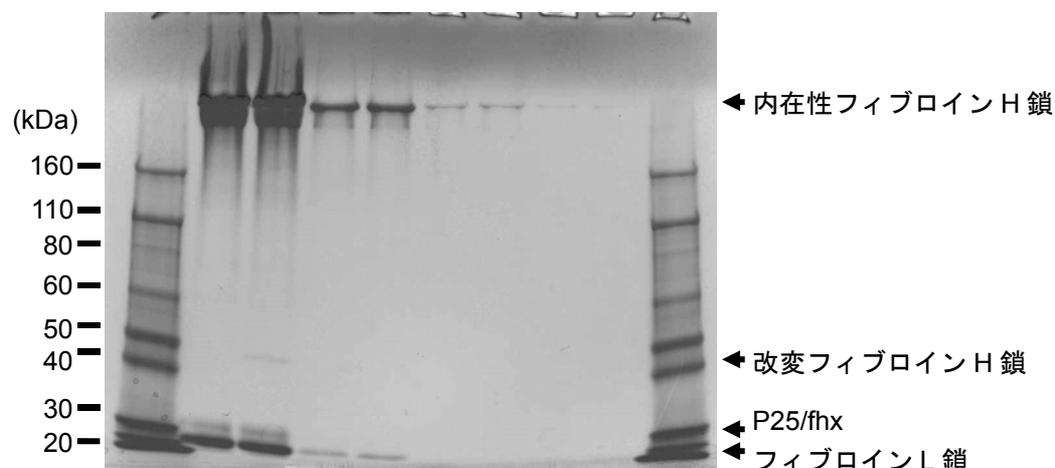
対照となる非遺伝子組換えカイコ 中 515 号×中 514 号

精練のため、繭層 200 mg を 40 ml の 8 M 尿素に入れて 90℃ で 1 時間置いた後に、8 M 尿素及び水での洗浄、エタノールでの脱水を経て、80℃、30 分で乾燥させた。得られた試料 80 mg を 2 ml の溶解液（9 M LiBr、10 mM Tris-HCl (pH 9.0)）に入れて 37℃ で 3 時間置いて溶解させた。これを、SDS-PAGE（Bio-Rad TGX Gel 7.5%）にかけ、ATTO EzStain AQua で染色した。

## 【結果】

図のとおり、改変フィブロイン H 鎖タンパク質は遺伝子組換えカイコでのみ検出された。SDS-PAGE での改変フィブロイン H 鎖タンパク質のバンドの染色性は、内在性のフィブロイン H 鎖タンパク質の 200 分の 1 と同程度であった。

1 レーンの タンパク質量	30 μg		3 μg		0.3 μg		0.15 μg	
	非 組 換 え	組 換 え	非 組 換 え	組 換 え	非 組 換 え	組 換 え	非 組 換 え	組 換 え







## 別添 19 繭糸および生糸の特性

### 【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、繭糸および生糸の特性を比較した。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500 (G <sub>3</sub> )
対照となる非遺伝子組換えカイコ	中 515 号×中 514 号

### 繊度試験

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの繭 10 個ずつについて、一粒繰り繰糸機（ハラダ製、枠周 1.125 m）を用いて繰糸を行なった。巻き取り 50 回（56.25 m）ごとに繭糸を繰糸機から取り外して乾燥させた後、温度 20℃、湿度 65% で 24 時間静置してから秤量した。この値を繭糸繊度（デニール、d、9,000 m 当たりの重さを g で示した単位）に換算し、繭 1 個ずつの平均繭糸繊度を求めた。

### 強度試験

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれの繭から、繭検定用自動操糸機（日産自動車、CT2 型）を用い、旧繭検定法に準じて、目的繊度 27 d、繰糸速度 200 m/min で繰糸して生糸を得た。これから、検尺器により 100 回繊度糸（長さ 112.5m の生糸）を作製し、温度 20℃、湿度 65% で 24 時間静置してからテンシロン（オリエンテック、TRA-100）を用いて強度を測定した。測定に用いた試料長は 100 mm、延伸速度は 150 mm/min、試験回数は 50 回とした。

### 染色性試験

ローダミンとフラビンそれぞれの染料を水 100 ml に投入して 0.05% の染液を作製し、湯煎器を用いて 60℃ まで間接加熱した。ここに、強度試験と同様に作成した 100 回繊度糸を入れ、緩やかに攪拌しながらさらに温度を上げて染色した。その後、色落ちしなくなるまで水洗いしてから風乾した。明度と色彩値は色彩色差計（コニカミノルタ、CR-400P）を用いて測定した。繰り返し回数は 5 回とした。

資料4. 審査データの概要

【結果】

織度および強度

系統	繭糸織度 (d)	強度 (g/d)
中 515 号×GCS500	1.35 ± 0.157	5.14 ± 0.0744
中 515 号×中 514 号	1.54 ± 0.0897	4.89 ± 0.247

平均±標準偏差

織度および強度ともに遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコで統計学的な有意差が認められた (どちらも  $P < 0.01$ )。

染色性

ローダミン染色

系統	L 値	a 値	b 値
中 515 号×GCS500	43.9 ± 1.96	71.1 ± 2.62	-9.29 ± 1.42
中 515 号×中 514 号	53.3 ± 0.698	70.9 ± 1.58	-15.1 ± 0.676
<i>P</i> (t 検定)	< 0.01	0.89	< 0.01

平均±標準偏差

フラビン染色

系統	L 値	a 値	b 値
中 515 号×GCS500	82.8 ± 0.925	-15.0 ± 1.55	95.8 ± 3.49
中 515 号×中 514 号	87.7 ± 0.743	-27.9 ± 0.804	79.3 ± 2.19
<i>P</i> (t 検定)	< 0.01	< 0.01	< 0.01

平均±標準偏差

L 値は明度で 0 (黒) ~100 (白)、a 値と b 値は色度で 0 で無彩色、a 値はプラスの方向は赤、マイナスの方向は緑が強く、b 値はプラスの方向は黄色、マイナスの方向は青が強くなる。

ローダミン染色およびフラビン染色どちらでも遺伝子組換えカイコの生糸の方で L 値が低く、濃く染まっていると認められた。



## 別添 21 幼虫期間の比較

## 【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、全齢を桑葉で飼育して、幼虫期間を比較した。4 齢起蚕で頭数を 200 頭ずつにそろえた。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500 (G <sub>7-2</sub> )
対照となる非遺伝子組換えカイコ	中 515 号×中 514 号

なお、幼虫期間とは、孵化した幼虫に最初の給餌を行ってから、繭形成の開始に伴って給餌を停止するまでの期間を言う。

## 【結果】

系統	幼虫期間 (日)
中 515 号×GCS500	22
中 515 号×中 514 号	23

遺伝子組換えカイコは非遺伝子組換えカイコに比べて 1 日短かった。



別添 23 幼虫の行動の比較

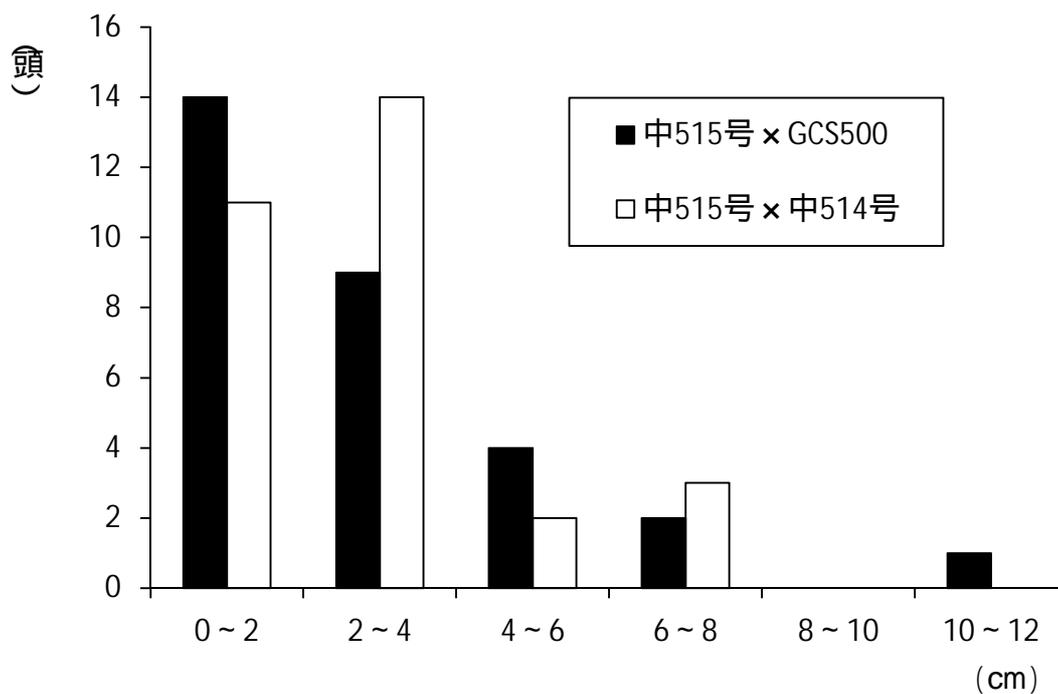
【方法】

5 齢 2 日目のカイコ幼虫を、半径 18 cm の円形の枠の中央に 1 頭ずつ置いて 12 時間放置し、それぞれのカイコが元の場所からどのくらいの距離を移動したかを記録する。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500 (G <sub>7.2</sub> )
対照となる非遺伝子組換えカイコ	中 515 号×中 514 号

【結果】

移動距離の平均値 (±標準偏差) は、遺伝子組換えカイコで 2.9 cm (±2.5 cm)、非遺伝子組換えカイコで 2.9 cm (±1.7 cm) であり、差は認められなかった (t 検定で  $P = 0.97$ )。また、移動距離を 2 cm ごとのヒストグラムに表すと下図のようになった。



## 別添 24 産卵数の比較

## 【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 20 頭ずつのメス蛾を交尾・割愛させた後、半径 18 cm の円形の枠の中央に 1 頭ずつ置いて 24 時間放置して産卵させ、それぞれの産卵数を調査した。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500 (G <sub>7.2</sub> )
対照となる非遺伝子組換えカイコ	中 515 号×中 514 号

## 【結果】

1 頭当たりの産卵数は以下のとおりとなった。

系統	平均±標準偏差
中 515 号×GCS500	531±179
中 515 号×中 514 号	736±168

遺伝子組換えカイコの産卵数は非遺伝子組換えカイコの産卵数より少なかった（差がないことを帰無仮説とした t 検定で  $P < 0.001$ ）。



別添 26 植物の発芽や生育に与える影響の比較

【方法】

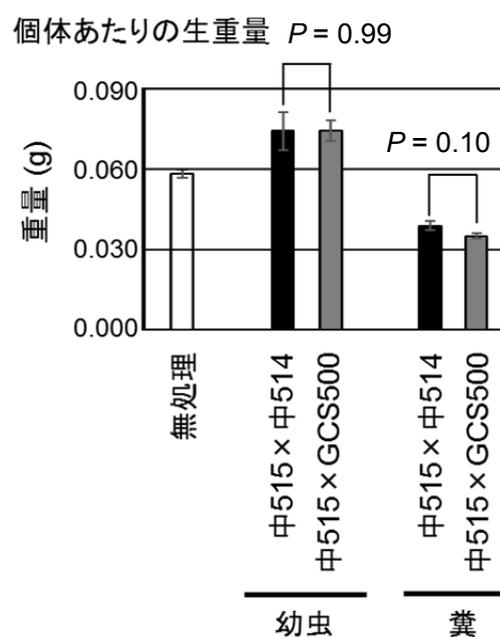
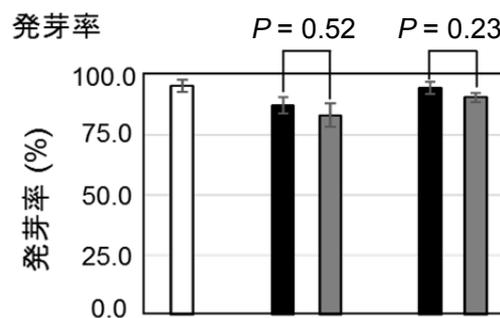
冷凍保存したカイコ 5 齢幼虫または糞を凍結乾燥して粉末とし、これを 1%混入した無肥粒状培土を連結トレイ (7.5 cm 角) に 100 g ずつ入れ、1 穴にブロッコリー (緑嶺) 種子 30 粒を播種した (各試験区について 5 反復)。これを 20°C・自然光の条件に置き、播種後 7 日で発芽数を調査し、2 週間で地上部を回収して、一株当たりの新鮮重を調査した。試験期間中に施肥は行っていない。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ 中 515 号×GCS500 (G<sub>7,2</sub>)

対照となる非遺伝子組換えカイコ 中 515 号×中 514 号

【結果】

図に示すとおり、発芽率と地上部の重量ともに、遺伝子組換えカイコと、対照となる非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった (t 検定、データの正規性、等分散性についてはいずれも棄却されなかった。発芽率については逆正弦変換後の t 検定も行い P 値は幼虫で 0.58、糞で 0.20 であった。)



別添 27 土壤微生物に与える影響の比較

【方法】

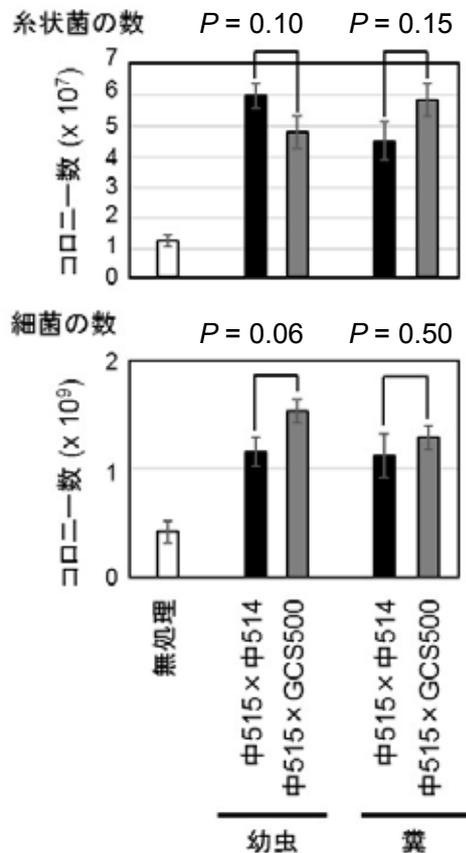
冷凍保存したカイコ 5 齢幼虫または糞を凍結乾燥して粉末とし、前年に麦を栽培した畑の土（土壤消毒していない）に 1%の割合で混和した。この土壤 100g に滅菌水 50 ml を加えて湿潤させ、25°C で 2 週間培養した。その後、5 g を秤量して 45 ml の滅菌水と混合した後、 $10^2 \sim 10^6$  倍希釈液を作成した。糸状菌については、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  倍希釈液 200  $\mu$ l を直径 9 cm シャーレのローズベンガル培地上に塗布し、25°C で 3 日間培養した後、コロニー数を調査した（各試験区について 5 反復）。細菌・放線菌については、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  倍希釈液 200  $\mu$ l を直径 9 cm シャーレの PTYG 培地上に塗布し、25°C で 3 日間培養した後、コロニー数を調査した（各試験区について 5 反復）。

供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号 × GCS500 ( $G_{7-2}$ )
対照となる非遺伝子組換えカイコ	中 515 号 × 中 514 号

【結果】

図に示すとおり、糸状菌と細菌・放線菌ともに、遺伝子組換えカイコと、対照となる非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった ( $t$  検定で  $P > 0.05$ )。



## 別添 29 高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H, Bombyx mori*）（中 515 号×GCS500）隔離飼育 区画試験の計画

### 1 使用するカイコ品種

遺伝子組換えカイコとして高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H, Bombyx mori*）（中 515 号×GCS500）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）を飼育する。

### 2 試験の目的

養蚕農家での本遺伝子組換えカイコの第一種使用等による糸繭生産に向けて、本遺伝子組換えカイコをパイプハウス蚕室及びプレハブ蚕室の2種類の構造の蚕室で、養蚕農家と同様の環境、規模及び方法で飼育した場合、生育及び行動の特性について非遺伝子組換えカイコとの違いの有無を確認するとともに、付与した繭の特性・品質の安定性等を調査する。また、実際の養蚕農家を飼育に参加させ、遺伝子組換えカイコの飼育技術の指導を実施するとともに、養蚕農家における遺伝子組換えカイコの実際的な飼育管理手法を取りまとめる。

### 3 本隔離飼育区画試験で想定する養蚕農家での飼育形態

本隔離飼育区画試験においては、本遺伝子組換えカイコの養蚕農家での飼育形態について、一般の養蚕農家での状況に即して、以下のように想定する。

- ・飼育は3齢または4齢から繭の形成までとし、繭（蛹）を不活化する。
- ・蚕室はパイプハウスやプレハブ等の比較的簡素な構造とする。
- ・桑葉を枝ごと与えて飼育する。
- ・毎回の飼育終了後に飼育残渣を蚕室から搬出する。
- ・飼育残渣については、粉碎による殺虫処理を行うという想定に加えて、本隔離飼育区画試験の結果から、特段の処理を講じなくても生物多様性影響が生じない可能性についても検討する。

### 4 試験の場所

群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（別紙1図2、以下「隔離飼育区画」という。）において試験を行う。本試験における飼育は3齢幼虫から繭の形成までとし、隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室（別紙1図5）及びプレハブ蚕室（別紙1図7）（以下合わせて「各蚕室」という。）において行う。飼育残渣の管理手法の試験は、隔離飼育区画内の残渣処理室（別紙1図9）において行う。

### 5 飼育の方法

- ・幼虫には、枝についたままの桑葉を与える。

- ・1回に飼育する頭数は、各蚕室ともに、本遺伝子組換えカイコ及び対照とする非遺伝子組換えカ

## 資料4. 審査データの概要

イコとの合計で約 60,000 頭までとする。

- ・パイプハウス蚕室の場合、別紙 1 に従って、内側全体に 4 mm 目以下の網を張っており、気温が高い場合等、環境条件に応じて、側面の外側フィルムを巻き上げたり、天井や妻面の外側フィルムを開けたりすることがある。
- ・プレハブ蚕室の場合、別紙 1 に従って、開閉可能な窓及び戸（出入口を除く。）並びに換気口には 4 mm 目以下の網を張っており、気温が高い場合等、環境条件に応じて、窓や戸を開けることがある。
- ・そのほか、別紙 2 に従って作業する。

### 6 他の遺伝子組換えカイコ系統と同時に飼育する場合の混入防止措置

本申請に係る本遺伝子組換えカイコの飼育にあたっては、繭や蛹等をすべて不活化するなど、別紙 2 に従って作業することにより成虫を生じさせないこととしているが、その上で、他の遺伝子組換えカイコ系統と同時に同じ蚕室内で飼育して試験を実施する場合に、異なる遺伝子組換えカイコ系統同士の混入を防止する措置について以下に記載する。

まず、カイコ幼虫の性質として、飼育容器から出たとしても別の飼育容器の中に移動することは考えにくい。繭を形成する前に活動が活発になる場合でも、繭を形成させるための器具（簇）は天井から吊るされており、他の簇に移動することは考えにくい。その上で、飼育作業等の人為的な要因による混入を防止するため、以下の措置を執る。

- ・一つの飼育容器や簇には一つの遺伝子組換えカイコ系統だけを入れる。
- ・異なる遺伝子組換えカイコ系統の飼育作業の間で、衣服等にカイコが付着していないことを確認する。
- ・飼育容器外のカイコは飼育容器に戻さず、捕殺や不活化等を行って廃棄する。
- ・繭を形成させている時期は、簇から落下したカイコを回収するため、簇の下に容器等を置く。
- ・可能であれば、繭色の異なる遺伝子組換えカイコ系統を用いる。

### 7 遺伝子組換えカイコを使用する試験の内容（非遺伝子組換えカイコとの比較試験）

#### （1）比較試験に供するカイコの準備

- ・各蚕室ともに、比較試験に供するカイコの数、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ約 6,000 頭とし、それ以外に、繭及び糸の品質試験に供する本遺伝子組換えカイコを飼育する。
- ・得られた試験結果により、必要に応じて、それ以降の飼育において比較試験に供するカイコの数を変更する。その場合も、比較試験に供する本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコはほぼ同数となるようにする。
- ・比較試験に供するカイコ幼虫を隔離飼育区画に運び込む際は、原則として生育の経過等による選抜は行わない。

## 資料4. 審査データの概要

### (2) 生育経過

- ・繭を作るまでに要する日数や斉一性（繭を作る時期にあるカイコ幼虫の割合を目視で確認し、すべての幼虫を1日のうちに蔭に移すことができるか、生育の遅いカイコ幼虫を翌日以降に蔭に移すことにするかを、養蚕農家での飼育に準じて判断した結果）
- ・早熟個体（三眠蚕）の発生の有無（もしあればその数や発生状況）
- ・繭を回収するまでの成虫の発生の有無（もしあればその数や発生状況）
- ・繭を作った個体の割合
- ・2頭以上が一つの繭を作る玉繭の割合

### (3) 繭の特性・品質の安定性

- ・蛹及び脱皮殻を含む繭の重さ（繭重）
- ・蛹及び脱皮殻を除く繭の重さ（繭層重）
- ・絹糸の染色性やその均一性

### (4) 幼虫の行動の特性

毎回の飼育作業時に以下の項目を調査する。

- ・飼育台から出ている幼虫の有無（もしあればその数及び発見場所）
- ・作業者が各蚕室から退出する際の幼虫の付着の有無（もしあればその数及び付着場所）
- ・作業者及び桑葉運搬用の車両等が隔離飼育区画から退出する際の幼虫の付着の有無（もしあればその数及び付着場所）

### (5) 繭の形成

毎回の飼育作業時に以下の項目を調査する。

- ・幼虫の飼育期間中に早めに作られる繭の有無（もしあればその数及び場所）
- ・繭の形成時に蔭の外で作られる繭の有無（もしあればその数及び場所）

### (6) 飼育残渣の処理

本試験において搬出される飼育残渣の量は、12,000頭の飼育で約400kgと推計している。本試験において飼育残渣を粉砕して殺虫する粉砕機（共立、ウッドチップパーKCM125DX）は、1時間あたり200kg程度の飼育残渣を粉砕可能である。最大量となる合計120,000頭の飼育を行った場合、4,000kgの飼育残渣が搬出され、その粉砕には合計20時間が必要と見積もられる。1日あたり5時間の作業を想定すると、4日で処理できると考えられる。また、国立研究開発法人農業生物資源研究所の隔離飼育区画での第一種使用による試験飼育において、網で覆って管理した飼育残渣中に成虫の発生が認められたのは、繭形成開始から2週間程度経過した後であった。したがって、上蔭から7日以内に飼育残渣の粉砕を完了させることにより、飼育残渣中に成虫が発生するのを防ぐこと

## 資料4. 審査データの概要

ができると考えられる。

本試験においては、飼育残渣の処理経過の記録から、飼育残渣を粉砕して殺虫する方法について、飼育規模に応じた適切な処理頻度や時間等を検証し、処理手順の効率化及び簡便化を検討する。また、粉砕処理前の飼育残渣に含まれる幼虫や繭の数について、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコを比較する調査も実施する。

### (7) 遺伝子組換えカイコの飼育管理手法の確立

養蚕農家に近い構造や規模の蚕室を用いて、実際の養蚕農家が飼育に参加することで、養蚕農家において生物多様性影響を効果的に防ぎながら効率的に遺伝子組換えカイコを飼育する管理手法を確立し、生物多様性影響や法令遵守に関することの教育も含め、マニュアル化する。

## 8 飼育後の処理

本遺伝子組換えカイコを用いた試験の終了後は、使用したサンプル等を、別紙2に従って適切に処理する。

## 引用文献リスト

- Berghammer A. J., Klingler M., and Wimmer E. A. (1999) A universal marker for transgenic insects. *Nature*, 402, 370-371.
- Cary L. C., Goebel M., Corsaro B. G., Wang H.-G., Rosen E., and Fraser M. J. (1989) Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 172, 156-169.
- Daimon T., Fujii T., Fujii T., Yokoyama T., Katsuma S., Shinoda T., Shimada T. and Ishikawa Y. (2012) Reinvestigation of the sex pheromone of the wild silkworm *Bombyx mandarina*: the effects of bombykal and bombykyl acetate. *J. Chem. Ecol.*, 38, 1031-1035.
- Handler A. M. (2002) Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, 1211-1220.
- Horn C and Wimmer E. A. (2000) A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev. Genes Evol.*, 210, 630-637.
- Kawanishi Y., Banno Y., Fujimoto H., Nho S. K., Tu Z., Mita K., Tsuchida K., Takada N., Maekawa H., and Nakajima Y. (2008) Method for rapid distinction of *Bombyx mandarina* (Japan) from *B. mandarina* (China) based on rDNA sequence differences. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 77, 79-85.
- Kojima K., Kuwana Y., Sezutsu H., Kobayashi I., Uchino K., Tamura T., and Tamada Y. (2007) A new method for the modification of fibroin heavy chain in the transgenic silkworm. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2943-2951.
- Kuwahara Y. (1984) Flight time of *Bombyx mandarina* males to a pheromone trap baited with bombykol. *Appl. Entomol. Zool.*, 19, 400-401.
- Kuwahara Y., Mori N., Yamada S., and Nemoto T. (1984) Evaluation of bombykol as the sex pheromone of *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 19, 265-267.
- Mounier N. and Prudhomme J. C. (1991) Differential expression of muscle and cytoplasmic actin genes during development of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 21, 523-533.
- Nakamura T., Banno Y., Nakada T., Nho S. K., Xü M. K., Ueda K., Kawarabata T., Kawaguchi Y., and Koga K. (1999) Geographic dimorphism of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, in the chromosome number and the occurrence of a retroposon-like insertion in the arylphorin gene. *Genome*, 42, 1117-1120.
- Sasaki M. and Jibiki F. (1984) Timing of the sexual behavior of wild and domestic silk moths. *Appl. Entomol. Zool.*, 20, 99-101.
- Sheng G., Thouvenot E., Schmucker D., Wilson D. S. and Desplan C. (1997) Direct regulation of *rhodopsin 1* by *Pax-6/eyeless* in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev.*, 11, 1122-1131.
- Takiya S., Hui C.-c., and Suzuki Y. (1990) A contribution of the core-promoter and its surrounding regions to the preferential transcription of the fibroin gene in posterior silk gland extracts. *EMBO J.* 9, 489-496.
- Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Kômoto N., Thomas J.-L., Mauchamp B., Chavancy G., Shirk P., Fraser M., Prudhomme, J.-C., and Couble P. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nature Biotechnol.*, 18, 81-84.

#### 資料4. 審査データの概要

- Thomas J.-L., Da Rocha M., Besse A., Mauchamp B., and Chavancy G. (2002) 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 247-253.
- Yang T.-T., Cheng L., and Kain S. R. (1996) Optimized codon usage and chromosome mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein *Nucleic Acids Res.*, 24, 4592-4593.
- Yukuhiro K., Iwata K., Kômoto N., Tomita S., Itoh M., and Kiuchi M. (2012) Nucleotide sequences of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene show clear differences between the domesticated silkworm *Bombyx mori* and the wild mulberry silkworm *Bombyx mandarina* from Japan. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 81, 29-35.
- Yukuhiro K., Sezutsu H., Itoh M., Shimizu K., and Banno Y. (2002) Significant levels of sequence divergence and gene rearrangement have occurred between the mitochondrial genome of the wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1385-2389.
- 大場治男 (1939a) 桑蚕に関する調査 一、越年卵に於ける孵化並第一世代羽化期の不斉一に就て。衣笠蚕報 396, 115-123.
- 大場治男 (1939b) 桑蚕蛾の飛来すること。衣笠蚕報 397, 201-202.
- 大村清之助 (1950) 桑蚕の生態習性及び繭に関する調査。蚕糸試験場報告 13, 79-130.
- 飯塚哲也・行弘研司 (2007) 野外におけるカイコ遺伝子拡散の可能性評価手法の開発。遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究(プロジェクト研究成果シリーズ 447), 100-102.
- 植田吉純 (2006) カイコを利用した動物用医薬品の生産。蚕糸・昆虫バイオテック 75, 129-130.
- 川口栄作 (1934) 単性生殖蚕の遺伝学的並に細胞学的解析。日本蚕糸学雑誌 5, 1-20.
- 河原畑勇 (1998) クワコとカイコ。文部省科学研究費補助金基盤研究(A) (2)研究成果報告書(別冊) 課題番号: 07406004.
- 小泉二郎・松田洋子 (1960) 蚕座における蚕児の水平移動。蚕糸研究 36, 3-12.
- 小泉二郎・塩見昭男・小針洋子 (1962) 家蚕における羽化の早晚と産卵速度。蚕糸研究 40, 7-10.
- 河本夏雄・津田麻衣・岡田英二・飯塚哲也・桑原伸夫・瀬筒秀樹・田部井豊 (2014) 遺伝子組換えカイコの飼育における生物多様性影響の評価手法の構築。蚕糸・昆虫バイオテック 83, 171-179.
- 児玉彌曾衛 (1927) 家蚕と野蚕の交配。佐久良会雑誌 21, 59-64.
- 蚕糸・絹業提携支援センター (2015) シルクレポート、41.
- 高見丈夫 (1969) 蚕種総論、全国蚕種協会
- 竹内孝三 (1954) 四眠交雑種から発現した三眠蚕について。日本蚕糸学雑誌 23, 83-88.
- 中村隆・伴野豊・徐孟奎・中田徹・河口豊・古賀克己 (1996) 中国産クワコとカイコとの雑種後代個体における染色体構成。九州蚕糸 27, 31.
- 中村隆・伴野豊・河口豊 (1997) カイコとクワコとの間における生殖隔離の程度。九州蚕糸 28, 30.

#### 資料4. 審査データの概要

- 中村隆・伴野豊・河口豊・古賀克己（1999）効率的なクワコの採卵方法. 日本蚕糸学雑誌 68, 165-166.
- 名和梅吉（1936）桑樹害虫クワゴに就いて. 昆虫世界 40, 2-5.
- 蝻木理・竹田敏（1982）クワコの全齢人工飼料育. 日本蚕糸学雑誌 51, 237-238.
- 日本蚕糸学会編（1992）蚕糸学入門、大日本蚕糸会
- 農林水産省（2009）平成20年度蚕業に関する参考統計
- 農林水産省農産園芸局（1998）特徴ある蚕品種—「中514号×中515号（愛称：はくぎん）」、技術資料 134, 3-4.
- 橋本春雄・佐藤京二（1958）松本市におけるクワコの羽化時期. 日本蚕糸学会中部支部講演集 14, 9.
- 伴野豊・中村隆（1999）クワコをめぐる最近の話題(3) —外部形態・染色体—. 野蚕 (Wild Silkworm News) 37, 6-7.
- 福田紀文（1979）総合蚕糸学、日本蚕糸新聞社
- 普後一（1982）カイコガの羽化行動とそのホルモン制御. 日本蚕糸学雑誌 51, 523-527.
- 見波定治・大場治男（1939）桑蚕と家蚕との交雑種に就て. 衣笠蚕報 394, 71-82.
- 村上聡・岩松琢磨・北村優・北澤裕太・片田美幸・藤森遼・横山岳・蝻木理（2010）カイコの成虫生存期間の分布に関する系統間差異. 蚕糸・昆虫バイオテック 79, 53-59.
- 森精 編著（1995）カイコと教育・研究、サイエンスハウス
- 山本俊雄・間瀬啓介・長坂幸吉・岡田英二・伊坪友子・宮島たか子・榎島守利・熊井敏夫・和泉清二（1999）極細織度蚕品種「はくぎん」の育成. 日本蚕糸学雑誌 68, 125-132.
- 横山桐郎（1929）最新日本蚕業害虫全書、明文堂